

THESE

pour obtenir le grade de

Docteur

Spécialité : Chimie des Substances Naturelles.

Présentée et soutenue publiquement par

Emeline HOUËL le 1^{er} juillet 2011

A Cayenne, Guyane française

ETUDE DE SUBSTANCES BIOACTIVES ISSUES DE LA FLORE AMAZONIENNE

ANALYSE DE PREPARATIONS PHYTOTHERAPEUTIQUES A BASE DE QUASSIA AMARA L. (SIMAROUBACEAE) ET PSIDIUM ACUTANGULUM DC. (MYRTACEAE) UTILISEES EN GUYANE FRANÇAISE POUR UNE INDICATION ANTIPALUDIQUE

IDENTIFICATION ET ANALYSE METABOLOMIQUE D'HUILES ESSENTIELLES A ACTIVITE ANTIFONGIQUE

Devant le jury composé de :

Dr. Martine HOSSAERT	Rapporteur
Dr. Bruno FIGADERE	Rapporteur
Dr. Angélique QUILICHINI	Examinatrice
Dr. Didier STIEN	Directeur de thèse
Dr. Véronique EPARVIER	Co-directrice de thèse

Chaque goutte de sève contient la plénitude de l'arbre entier.

Maharishi Mahesh Yogi

*Accuse not Nature: she hath done her part; do thou but thine, and be not diffident of wisdom, if thou dismiss
not her, when most thou needest her nigh.*

John Milton, *Lost Paradise*

Si t'es assez acharnée pour décoincer un morse d'une porte, t'as la niaque pour terminer une thèse...

Maloup & Marie Voyelle, *Les Envahissants*

Remerciements

Je tiens tout d'abord à remercier mon directeur de thèse, Didier Stien, pour m'avoir supportée – dans tous les sens du terme ! – pendant plus de 6 ans lors de notre collaboration au laboratoire de chimie, et pour m'avoir accompagnée tout au long de ce travail de thèse. Didier, tu trouves que cette thèse ressemble à son auteur, mais à mon avis elle reflète aussi la vision de la recherche que tu as portée pendant tes années en Guyane. Merci donc infiniment pour cet apprentissage...

Un immense merci également à ma co-directrice, Véronique Eparvier, qui m'a également beaucoup apporté pendant la réalisation de ce travail (et en particulier une publication salvatrice sur la description du spectre de RMN du β -D-xylopyranose...).

Toute ma gratitude également aux autres membres du jury : Angélique Quilichini, qui a bien voulu en assumer la présidence, ainsi que Martine Hossaert et Bruno Figadère, mes rapporteurs. C'était un honneur, et un immense plaisir que de présenter ce travail devant vous, et j'espère que nous aurons l'occasion ces prochaines années de nous retrouver à nouveau pour travailler ensemble.

A Eric Deharo, qui parmi les premiers m'a encouragée à me lancer dans ce travail de thèse, et qui m'a toujours conseillée et soutenue, toute ma gratitude et mon amitié. Eric, tu m'as comme Didier accueillie à mon arrivée en Guyane, et cet accueil a je pense largement contribué à l'enthousiasme avec lequel je me suis lancée dans l'étude des mystères de la tisane de *Quassia*. Je te souhaite un bon « retour » en métropole, et beaucoup de bonheur pour les années à venir.

Je ne peux remercier Eric sans parler des collègues de la « *Quassia team* » de l'UMR 152 IRD/UPS, et en particulier Stéphane Bertani, Geneviève Bourdy, Valérie Jullian et Alexis Valentin. Travailler avec vous est un plaisir depuis toutes ces années, et je suis vraiment ravie que nous puissions continuer à collaborer sur d'autres projets. Merci à tous également pour les relations d'amitiés que nous avons pu établir, et merci en particulier à Stéphane pour ses questionnements existentiels qui m'accompagnent toujours... A très bientôt pour la suite !

Pour continuer dans le domaine des plantes médicinales, un grand merci à Marie Fleury pour m'avoir accordé sa confiance et permis de travailler avec elle sur *Psidium*. De la même façon, j'espère que nous aurons l'occasion ces prochaines années de construire d'autres projets communs.

Je ne peux penser à ces projets futurs sans remercier ici du fond du cœur mon collègue et ami Guillaume Odonne. Merci pour tout...

Merci également à tous les collègues du laboratoire de chimie, particulièrement à Alice Rodrigues, qui m'a fait découvrir le monde merveilleux des champignons pathogènes ! Alice, merci aussi pour ta bonne humeur, et ton soutien lors des moments difficiles que nous avons pu traverser ces dernières années. Je te souhaite

beaucoup de chance dans ta carrière à venir, et beaucoup de bonheur avec ta belle petite Mya. Merci également à Arnaud Jahn Oyac, Mehdi Khodjet el Khil et Célia Mauline, qui ont travaillé avec moi sur les sujets abordés ici, et à Séverine Chevalier, avec qui cette année de travail commune a été une grande joie !

Pour ce qui est des huiles essentielles, merci à toute l'équipe de KLR / Sylvestre / Xylane : Lucien Raguin, Pierre Silland, Julie-Anne Paquet, Delphine Machon et Clotilde Chalmandrier. Bonne chance à tous pour vos projets respectifs !

Un immense merci à Monsieur Jean-Marie Bessières, qui a eu la patience de m'initier aux arcanes des analyses GC/MS. Merci pour votre aide, vos conseils, et merci surtout pour le plaisir que vous m'avez offert à la lecture de vos messages. J'espère avoir le bonheur de vous rencontrer un jour, en Guyane ou à Montpellier, et je vais m'efforcer de trouver d'autres « excuses » pour pouvoir à nouveau vous écrire !

Parmi les gens qui m'ont formée, merci également à Roger Pichon et Nelly Kervarec, de l'Université de Brest, pour m'avoir tant appris en RMN. Je garde un excellent souvenir de mon passage chez vous, et ne vous oublie pas.

Merci également à tous les collègues de l'UMR EcoFoG qui m'ont soutenue au cours de ce travail. Je n'ose pas citer de noms de peur d'oublier quelqu'un ! J'espère que vous vous reconnaîtrez. Merci en particulier aux directeurs de l'unité, Eric Marcon et Marc Gibernau, pour avoir permis ce travail.

Merci à Anne Corval, directrice de l'USR CNRS-Guyane, qui en m'accueillant dans ses locaux m'a permis de terminer ma thèse dans les meilleures conditions. Merci à tous les collègues de l'USR pour leur bonne humeur quotidienne !

Merci également à André Spiegel, directeur de l'Institut Pasteur de la Guyane, pour avoir accueilli le laboratoire de chimie dans ses locaux, nous permettant ainsi de poursuivre nos activités. Merci également à Eliane Bourreau et à Philippe Lasnier d'avoir rendu concret cet accueil. Merci enfin à tous les collègues et amis de l'IPG qui m'ont soutenue dans le cadre de cette thèse.

A tous mes amis de Guyane et de métropole, en particulier le Dr Fabien Durola, pour ses excellents conseils. Vous êtes toujours dans mon cœur.

A ma famille,

A Guillaume, pour sa patience et son amour,

A Luna, mon ange, ma « princesse normale », et surtout « n'abandonne jamais » !

A N°2, qui m'a tenu compagnie pendant ces derniers mois. Rendez-vous bientôt...

Résumé / Abstract

L'objectif du travail effectué était la recherche de nouvelles substances actives d'origine végétale, présentant soit une activité antiplasmodiale soit une activité antifongique. Cette étude a été menée suivant deux stratégies différentes: l'étude de remèdes traditionnels antipaludiques identifiés suite à des enquêtes ethnopharmacologiques, et la mise en évidence des propriétés antifongiques d'huiles essentielles grâce à une stratégie bioinspirée. La première partie du travail a permis de mettre en évidence le rôle d'un quassinolide connu, la simalikalactone D, dans l'activité antipaludique d'une tisane de jeunes feuilles fraîches de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). Dans le cas de la décoction de rameaux de *Psidium acutangulum* DC. (Myrtaceae), c'est cette fois un mélange de flavonoïdes glycosylés qui est responsable de l'activité du remède. Dans le cadre de la recherche de nouvelles substances antifongiques, le criblage effectué a permis d'identifier de nombreuses huiles essentielles présentant des activités intéressantes, validant ainsi la démarche bioinspirée retenue dans ce cas. L'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* (Linden) Ronse a en particulier démontré une activité remarquable, à la fois seule et en combinaison avec des antifongiques azolés. Enfin, l'étude métabolomique de la composition des huiles essentielles a permis de mettre au point un outil pouvant orienter la sélection des huiles en fonction des données obtenues en GC/MS dans l'optique de la recherche de nouvelles substances antifongiques. Ce travail démontre donc la validité des stratégies retenues – ethnopharmacologie et bioinspiration – dans la recherche de nouvelles substances bioactives.

Mot-clés : Chimie des substances naturelles, paludisme, mycoses, dermatophytes, levures, remèdes traditionnels, métabolomique, *Plasmodium falciparum*, *Quassia amara* L., *Psidium acutangulum* DC., *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse.

The aim of this work was to search for new bioactive compounds, displaying either antiplasmodial or antifungal activity. Two strategies were developed here: the evaluation of traditional remedies identified as antimalarial through ethnopharmacological studies, and the search for antifungal essential oils, the criterion being here a bioinspired approach. Our work led to the discovery that the antimalarial activity of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) fresh young leaves was due to the presence of a known quassinoid, simalikalactone D. In the case of *Psidium acutangulum* DC. (Myrtaceae), a flavonol glycosides mixture explained the activity observed for the decoction. The search for antifungal essential oils from the Amazonian flora led to the identification of several interesting species, thus validating our bioinspired strategy. The essential oil of *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse was among the most active ones, either alone or in combination with azole drugs. Eventually, a metabolomic study of the GC/MS composition of these oils allowed us to develop a statistical tool which could help to select interesting antifungal products. This work thus demonstrates the major interest of the two strategies – ethnopharmacology and bioinspiration – for the search of new bioactive compounds.

Keywords : Natural substances chemistry, malaria, mycoses, dermatophytes, yeasts, traditional remedies, metabolomics, *Plasmodium falciparum*, *Quassia amara* L., *Psidium acutangulum* DC., *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse.

Sommaire

INTRODUCTION GENERALE.....	21
CHAPITRE 1 : « Des plantes, des hommes, des possibilités ».....	23
A. De la plante au principe actif : naissance de la chimie des substances naturelles	24
B. De la plante au médicament : développement de l'industrie pharmaceutique	27
C. Le cas particulier des médicaments à base de plantes	29
D. Métabolites secondaires des végétaux : quelles stratégies de recherche de nouvelles molécules ?	32
1. Les substances naturelles : d'anciens déchets de la biosynthèse devenus des composés irremplaçables	32
2. Présentation des stratégies de recherche.....	34
Ethnobotanique	34
Ecologie chimique et bioinspiration	36
E. Quel avenir pour la chimie des substances naturelles dans le développement de nouveaux médicaments ?	38
F. Plantes et hommes en Guyane française	42
CHAPITRE 2 : Faut-il ajouter un crabe ?.....	45
A. Le paludisme	46
1. Présentation du paludisme : du miasme des marais au cycle complexe de <i>Plasmodium</i>	46
2. Les traitements curatifs	49
3. Etat du paludisme en Guyane française, où l'animal le plus dangereux de la forêt amazonienne n'est pas toujours celui que l'on croit.....	52
4. Substances naturelles antiplasmodiales amazoniennes et médecine populaire	55
B. La tisane de <i>Quassia amara</i> L. : une « recette de grand-mère » contre le paludisme.....	57
1. <i>Quassia amara</i> L. (Simaroubaceae), le « quinquina de Cayenne » : historique, usages traditionnels et activités	57
2. Les quassinoïdes : origine, activités biologiques et relations structure-activité.....	59
3. Etude de préparations phytothérapeutiques à base de feuilles de <i>Q. amara</i> L.	63
4. Conclusion sur l'étude de préparations phytothérapeutiques à base de feuilles de <i>Q. amara</i> L.	76
C. <i>Psidium acutangulum</i> DC. (Myrtaceae), un remède Wayana contre le paludisme – <i>Takamalaïmë, malaleja wajana epit</i>	77
1. <i>P. acutangulum</i> DC., un remède original du Haut-Maroni	77

2. Etude de préparations phytothérapeutiques à base de rameaux de <i>Psidium acutangulum</i> DC.	79
Etude du lot MF2057	79
Comparaison des lots MF2057 et MF2100	81
Etude du lot MF2176	84
3. Conclusion de l'étude de préparations phytothérapeutiques à base de rameaux de <i>Psidium acutangulum</i> DC.	100
Chapitre 2 : conclusion.....	102
CHAPITRE 3 :La "Quinte Essence" amazonienne contre les mycoses.....	103
A. Terpènes et huiles essentielles.....	104
B. Les pathologies fongiques humaines.....	106
1. Infections fongiques : causes et description.....	106
2. Traitements actuels et problématiques rencontrées	108
Traitements.....	108
La question du développement des résistances	112
C. Etude de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse : une belle plante de Guyane contre les mycoses	113
1. <i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse (Plantaginaceae) : état de l'art	113
2. Obtention de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse.....	116
3. Détermination de la composition de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse par GC/MS.....	117
4. Confirmation de l'identification des molécules majoritaires par RMN ¹ H	119
5. Comparaison des compositions des huiles essentielles des lots 1 et 2 par GC/MS	125
6. Activité biologique de l'huile essentielle d' <i>O. azureus</i> et des ses constituants.....	129
7. Activité antifongique de l'huile essentielle d' <i>O. azureus</i> combinée avec des antifongiques azolés (itraconazole, fluconazole, cétoconazole)	135
8. Conclusion sur l'étude de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse.....	143
D. Criblage d'huiles essentielles et analyse métabolomique : vers un outil de prévision de l'activité antifongique ? ..	144
1. Comparaison des résultats d'activité antifongique de 23 huiles essentielles issues de la flore guyanaise par les méthodes de diffusion en cavité et de microdilution	144
Discussion sur les résultats obtenus d'un point de vue méthodologique.....	150
Espèces identifiées comme ayant une huile essentielle possédant des activités antifongiques.....	152

2. Etude statistique des données par analyse en composantes principales (ACP) : vers un outil de prévision de l'activité antifongique ?	158
3. Conclusion sur le criblage des huiles essentielles	165
Chapitre 3 : conclusion.....	167
Conclusion générale et perspectives.....	168
MATERIEL ET METHODES.....	109
1. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) analytique et semi-préparative	170
2. Analyses RMN (Résonance Magnétique Nucléaire).....	170
3. Analyses GC/MS (Chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse) des huiles essentielles et terpènes commerciaux	171
4. Test de microdilution sur levures et champignons dermatophytes	172
1. Récolte de <i>Psidium acutangulum</i> DC.....	175
2. Préparation des remèdes et extraits	175
Etude du lot MF2057	175
Comparaison des lots MF2057 et MF2100	176
Etude du lot MF2176	176
3. Protocole des analyses et fractionnements effectués en CLHP sur <i>Psidium acutangulum</i> DC.	178
Etude du lot MF2057	178
Comparaison des lots MF2057 et MF2100	178
Etude du lot MF2176	178
4. Mesure du pouvoir rotatoire des composés purs isolés	179
5. Tests d'activité sur le stade érythrocytaire de cultures de <i>Plasmodium falciparum in vitro</i>	180
Entretien de la culture de <i>Plasmodium falciparum in vitro</i>	180
Test de chimiosensibilité de <i>Plasmodium falciparum</i>	181
Entretien de la culture de <i>Plasmodium falciparum in vitro</i>	181
Test de chimiosensibilité de <i>Plasmodium falciparum</i>	182
Détermination de la parasitémie.....	182
Détermination des Concentrations Inhibitrices 50% (CI ₅₀).....	182
6. Evaluation de la toxicité sur lignée cellulaire VERO	183

1. Récolte du matériel végétal et obtention de l'huile essentielle.....	184
2. Fractionnement de l'huile essentielle par chromatographie sur colonne de silice	184
3. Evaluation de la toxicité sur lignée cellulaire VERO	185
4. Tests de synergie entre l'huile essentielle et des antifongiques azolés (itraconazole, fluconazole, cétoconazole) sur levures et champignons dermatophytes	186
1. Préparation des huiles essentielles	189
2. Test de diffusion en cavité (<i>Figure 71</i>).....	189
3. Etude métabolomique des données GC/MS obtenues pour les huiles essentielles	190
Conversion des données.....	190
Traitement des données sous MZmine 2	190
Traitement des données sous Excel 2010	193
Traitement des données sous XLstat version 3.02	194
BIBLIOGRAPHIE.....	195
ANNEXES.....	196
Annexe 1 : Fiche produit et spectres de RMN ¹ H, ¹³ C (Jmod), HMQC, HMBC, COSY et NOESY de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B)	222
Spectre de RMN ¹ H de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B).....	223
Spectre de RMN ¹³ C (Jmod) de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B)	224
Spectre de RMN HMQC de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B)	225
Spectre de RMN HMBC de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B).....	226
Spectre de RMN COSY de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B)	227
Spectre de RMN NOESY de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B).....	228
Annexe 2 : Fiche produit et spectres de RMN ¹ H, ¹³ C, HMQC, HMBC, COSY et NOESY de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B) dans le CDCl ₃	229
Spectres de RMN ¹ H de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B) dans le CDCl ₃	230
Spectre de RMN ¹³ C de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B) dans le CDCl ₃	231
Spectre de RMN HMQC de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B) dans le CDCl ₃	232
Spectre de RMN HMBC de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B) dans le CDCl ₃	233
Spectre de RMN COSY de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B) dans le CDCl ₃	234
Spectre de RMN NOESY de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2- <i>O</i> -methylnpicrasine B) dans le CDCl ₃	235

Annexe 3 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et ^{13}C (Jmod) de la picrasine B dans le CD_3CN	236
Spectre de RMN ^1H de la picrasine B dans le CD_3CN	237
Spectres de RMN ^{13}C (Jmod) de la picrasine B dans le CD_3CN	238
Annexe 4 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et ^{13}C (Jmod) de la picrasine H (2- <i>O</i> -methylpicrasine B) dans le CD_3CN	239
Spectre de RMN ^{13}C (Jmod) de la picrasine H (2- <i>O</i> -methylpicrasine B) dans le CD_3CN	241
Annexe 5 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et ^{13}C de la néoquassine et isomère (60 : 40) dans le CDCl_3	242
Spectre de RMN ^1H de la néoquassine et isomère (60 : 40) dans le CDCl_3	243
Spectre de RMN ^{13}C de la néoquassine et isomère (60 : 40) dans le CDCl_3	244
Annexe 6 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et HMQC de la simalikalactone D dans le CD_3CN	245
Spectre de RMN ^1H de la simalikalactone D dans le CD_3CN	246
Spectre de RMN HMQC de la simalikalactone D dans le CD_3CN	247
Annexe 7 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et gHSQCAD de la (+)-catéchine (1) dans l'acétone- d_6	248
Spectre de RMN ^1H de la (+)-catéchine (1) dans l'acétone- d_6	249
Spectre de RMN gHSQCAD de la (+)-catéchine (1) dans l'acétone- d_6	250
Annexe 8 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H , gHSQCAD, gHMBCAD et COSY de la quercitrine-3- <i>O</i> - β -D-xylofuranoside (3) dans le CD_3OD	251
Spectre de RMN ^1H de la quercitrine-3- <i>O</i> - β -D-xylofuranoside (3) dans le CD_3OD	252
Spectre de RMN gHSQCAD de la quercitrine-3- <i>O</i> - β -D-xylofuranoside (3) dans le CD_3OD	253
Spectre de RMN gHMBCAD de la quercitrine-3- <i>O</i> - β -D-xylofuranoside (3) dans le CD_3OD	254
Spectre de RMN COSY de la quercitrine-3- <i>O</i> - β -D-xylofuranoside (3) dans le CD_3OD	255
Annexe 9 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et gHSQCAD de la reynoutrine (quercitrine-3- <i>O</i> - β -D-xylopyranoside) (4) dans le CD_3OD	256
Annexe 10 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et gHSQCAD de la guaijaverine (quercitrine-3- <i>O</i> - α -L-arabinopyranoside) (5) dans le CD_3OD	259
Annexe 11 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et gHSQCAD de l'avicularine (quercitrine-3- <i>O</i> - α -L-arabinofuranoside) (6) dans le CD_3OD	262
Annexe 12 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et gHSQCAD de la quercitrine (quercitrine-3- <i>O</i> - α -L-rhamnopyranoside) (7) dans le CD_3OD	265

Annexe 13 : Composition chimique de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse.....	268
Annexe 14 : Spectre de RMN ¹ H de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse (lot 2) dans le CDCl ₃	271
Annexe 15 : Spectre de RMN ¹ H de la fraction F14 obtenue à partir de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse (lot 2) et composée de β-copaèn-4-α-ol (spectre dans le CDCl ₃)	272
Annexe 16 : Spectre de RMN ¹ H de l'α-humulène (standard commercial) dans le CDCl ₃	273
Annexe 17 : Spectre de RMN ¹ H de l'α-copaène (standard commercial) dans le CDCl ₃	274
Annexe 18 : Spectre de RMN ¹ H du myrténal (standard commercial) dans le CDCl ₃	275
Annexe 19 : Spectre RMN ¹ H du <i>trans</i> -pinocarvéol (standard commercial) dans le CDCl ₃	276
Annexe 20 : Spectre RMN ¹ H du viridiflorol dans la fraction F12 (38 % selon l'analyse GC/MS, et 23 % de β-copaèn-4-α-ol) dans le CDCl ₃	277
Annexe 21 : Comparaison des chromatogrammes (normalisés) obtenus pour les deux lots d'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse : lot 1 PSN43 (mars 2007) et lot 2 Phi19 (mars 2008) : chromatogramme complet et focalisation sur la zone des monoterpènes.....	278
Annexe 22 : Chromatogrammes obtenus pour les huiles essentielles soumises à l'analyse en composantes principales, classés par catégories	280
Annexe 23 : Analyses GC/MS des fractions obtenues par chromatographie de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> sur colonne de silice (AgNO ₃ 1%, élution par un gradient hexane / dichlorométhane / acide acétique 2 %) après rassemblement.	283

Liste des illustrations

Figure 1 : Arbres à encens ramenés lors de l'expédition organisée par Hatchepsout au pays de Pount, un des remèdes utilisé en Egypte antique (temple de Deir el-Bahari).....	24
Figure 2 : Structure de la morphine (à gauche) et fleur de <i>Papaver</i> sp. (à droite, photographie G. Houël)	26
Figure 3 : Fleurs de digitale	26
Figure 4 : Structures de la D-tubocurarine (relaxant musculaire issu de <i>Chondrodendron tomentosum</i> Ruiz & Pav.) (à gauche) et de la réserpine (agent hypotenseur extrait de <i>Rauwolfia</i> spp.) (à droite).....	27
Figure 5 : <i>Taxus</i> sp. (photographie A. Rodrigues) et desacétyl-baccatine II (molécule de gauche) et paclitaxel (Taxol ®) (molécule de droite)	28
Figure 6 : Structures du salicoside (à gauche) et de l'acide acétylsalicylique (à droite)	28
Figure 7 : Des molécules responsables de la couleur des plantes, mais pas seulement.....	32
Figure 8 : Diversité structurale des métabolites secondaires des plantes – d'après Wink, M., <i>Phytochemistry</i> 64, p.4, 2003	33
Figure 9 : Structure de la galanthamine.....	35
Figure 10 : Exemples d'interactions plantes-insectes	36
Figure 11 : Structure de l' α -tomatidine	37
Figure 12 : Grignon au sol en forêt guyanaise (photo de droite) - rubrénolide (molécule de gauche) et rubrynlolide (molécule de droite) isolés de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de <i>S. rubra</i> (photographie A. Rodrigues).....	37
Figure 13 : Structures cycliques produites par le champignon endophyte CR115 pour la biosynthèse des guanacastépènes – d'après Brady et al., <i>J. Am. Chem. Soc.</i> 2001, 123, 9900-9901	40
Figure 14 : Ecosystèmes de Guyane française. De haut en bas : Village de Ouanary, estuaire de l'Oyapock – Petit inselberg des Nouragues – Marais de Kaw – Vers la canopée.....	42
Figure 15 : Carte des groupes humains de la Guyane française - source : Pharmacopées traditionnelles de Guyane française, Grenand P. et al., IRD Ed., 2004, 816 p.....	43
Figure 16 : Cycle biologique de <i>Plasmodium</i> . Source: CDC.	48
Figure 17 : Structures de la quinine et dérivés	50
Figure 18: Structures de l'artémisinine et dérivés.....	51
Figure 19 : Structures de l'atovaquone et du proguanil, molécules utilisées en combinaison dans la Malarone ®	52
Figure 20 : Evolution du nombre de cas de paludisme et de la population en Guyane française de 1982 à 2007 - Source : SDD - DSDS et INSEE	53
Figure 21 : Le risque de paludisme en Guyane - carte mise à jour le 18 mars 2011 après validation par le Comité de suivi des maladies transmissibles par les insectes en Guyane – Source : « le Point Epidémio CIRE Antilles-Guyane » – surveillance du paludisme N°03/20	54
Figure 22 : Structures de la strychnobrasiline (à gauche) et de la malagashine (à droite) isolées de l'écorce de <i>Strychnos myrtoïdes</i>	56
Figure 23 : Feuilles et fruit de <i>Quassia amara</i> L. (à gauche) et fleur (à droite, photographie G. Bouchon)	57
Figure 24 : Structure de la quassine et de la néoquassine, premiers quassinoides isolés de <i>Q. amara</i>	60
Figure 25 : Structures de la brucéantine, du brusatol et du yadanzolide S	60
Figure 26 : Structure de deux quassinoides présentant une activité antiplasmodiale	61

Figure 27 : Relations structure / activité des quassinoïdes à activité antiplasmodiale (exemple de la brucéantine).....	61
Figure 28 : Jeune feuille de <i>Q. amara</i> L. (photographie G. Bouchon)	64
Figure 29 : Feuilles, fleurs et fruits de <i>Quassia amara</i> L. (photographie G. Bourdy)	76
Figure 30 : Ecorce, feuilles et fleurs de <i>Syzygium australe</i> (Link) B. Hyland, une Myrtacée australienne	77
Figure 31 : Goiyave saut sur l'Oyapock (photo de gauche, arbustes à feuilles rouges au premier plan) - feuilles et fruit de <i>P. acutangulum</i> à Taluhwen (à droite, photographie Marie Fleury)	78
Figure 32 : Profil obtenu en CLHP semi-préparative pour le fractionnement de l'extrait PSI 2 de <i>P. acutangulum</i>	80
Figure 33 : Comparaison des profils obtenus en CLHP analytique pour les extraits au dichlorométhane des lots MF2057 et MF2100	82
Figure 34 : Comparaison des profils obtenus en CLHP analytique pour les extraits à l'acétate d'éthyle des lots MF2057 et MF2100	82
Figure 35 : Profil obtenu en CLHP semi-préparative pour le fractionnement de l'extrait PSI F de <i>P. acutangulum</i>	85
Figure 36 : Mise en évidence de l'activité antiplasmodiale des fractions de l'extrait PSI F sur le profil chromatographique	85
Figure 37 : Bilan des fractions et molécules pures obtenues à partir de l'extrait PSI F de <i>P. acutangulum</i>	86
Figure 38 : Composés isolés dans l'extrait à l'acétate d'éthyle de rameaux de <i>P. acutangulum</i>	87
Figure 39 : Interactions NOE importantes pour déterminer la structure du β -D-xylopyranose de la reynoutrine	91
Figure 40 : Interactions NOE importantes pour déterminer la structure de l' α -L-arabinopyranose de la guaijaverine	92
Figure 41 : Interaction NOE visible pour la détermination de la structure de l' α -L-rhamnopyranose de la quercitrine	95
Figure 42 : Tukusipan (carbet communautaire) du village de Taluhwen, Haut-Maroni (photographie P. Lecomte, 2005)	101
Figure 43 : Huiles essentielles obtenues au laboratoire de chimie à Cayenne	104
Figure 44 : Structure de quelques antifongiques usuels	111
Figure 45 : <i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse (photographie A. Jahn)	113
Figure 46 : <i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse : détail d'une feuille (à gauche) et fleur (à droite)	114
Figure 47 : Structure et proportion relative des molécules majoritaires de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> (Linden) Ronse	119
Figure 48 : Signaux caractéristiques des molécules identifiées dans le spectre de RMN ^1H de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> dans le CDCl_3 – spectre complet de l'huile essentielle	120
Figure 49 : Signaux caractéristiques des molécules identifiées dans le spectre de RMN ^1H de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> dans le CDCl_3 – partie du spectre correspondant aux groupements méthyles des molécules de l'huile	121
Figure 50 : Substituants des molécules de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> dont les déplacements ont été identifiés en RMN (α -copaène non représenté)	123
Figure 51 : Comparaison des chromatogrammes obtenus en GC/MS pour les deux lots d'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> - en haut: lot 2 (Phi19, mars 2008), en bas: lot 1 (PSN43, mars 2007) (colonne VF-5ms).	126
Figure 52 : Isobologrammes mettant en évidence les phénomènes de synergie ou d'antagonisme de l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> en combinaison avec des antifongiques azolés (itraconazole, fluconazole, itraconazole) sur l'inhibition de la croissance de levures (<i>C. albicans</i> , <i>C. parapsilosis</i>) et de champignons dermatophytes (<i>T. mentagrophytes</i> , <i>M. gypseum</i>)	141
Figure 53 : Fleurs de <i>Mikania micrantha</i> Kunth (à gauche) et <i>Cordia curassavica</i> (Jacq.) Roem. & Schult. (à droite)	144

Figure 54 : <i>Achetaria guianensis</i> Pennell (à gauche) et <i>Turnera odorata</i> Rich. (à droite)	145
Figure 55 : <i>Cymbopogon citratus</i> (DC.) Stapf. (à gauche) et fruits de <i>Protium heptaphyllum</i> (Aubl.) Marchand (à droite)	149
Figure 56 : Chromatogrammes en phase gazeuse et molécules majoritaires des deux lots d'huile essentielle de <i>Cymbopogon citratus</i> (lot 1: PSN84, en haut ; lot 2 : JA25, en bas) (colonne VF-5ms)	153
Figure 57 : Molécules majoritaires de l'huile essentielle de <i>Cymbopogon citratus</i>	154
Figure 58 : Chromatogramme en phase gazeuse et molécules majoritaires de l'huile essentielle de fruits verts de <i>Protium heptaphyllum</i> (colonne VF-5ms)	155
Figure 59 : Molécules majoritaires de l'huile essentielle de fruits immatures de <i>Protium heptaphyllum</i>	156
Figure 60 : Chromatogramme en phase gazeuse et molécules majoritaires de l'huile essentielle de <i>Pimenta racemosa</i> (colonne VF-5ms)	157
Figure 61 : Molécules majoritaires de l'huile essentielle de <i>Pimenta racemosa</i>	157
Figure 62 : Résumé des étapes de traitement et d'analyse des données dans une approche classique de métabolomique. D'après (Boccard et al., 2010; Katajamaa et Oresic, 2007).	159
Figure 63 : Analyse en composantes principales des profils GC/MS obtenus pour les huiles essentielles avec indications des scores d'activité antifongique sur les levures du genre <i>Candida</i>	161
Figure 64 : Analyse en composantes principales des profils GC/MS obtenus pour les huiles essentielles avec indications des scores d'activité antifongique sur les champignons dermatophytes filamenteux..	163
Figure 65 : Analyse en composantes principales des profils GC/MS obtenus pour les huiles essentielles avec indications des scores d'activité antifongique totale (levure et champignons dermatophytes filamenteux)..	164
Figure 66 : <i>Sphagneticola trilobata</i> (L.) Pruski.....	166
Figure 67 : Fractionnement de la décoction obtenue à partir du lot MF2057	176
Figure 68 : Fractionnement du lot MF2176.....	177
Figure 69 : Schéma de plaque utilisée pour les essais de combinaison entre l'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> et les antifongiques azolés	186
Figure 70 : Représentation graphique des isobologrammes. Les différents effets combinatoires pouvant être observés (additivité : carré ; synergisme : rond ; antagonisme : pentagone) sont indiqués.	188
Figure 71 : Schéma de principe du test de diffusion en cavité (perforation en agar) à gauche et photographie d'une boîte de Pétri inoculée avec de l'huile essentielle de <i>P. heptaphyllum</i> (souche <i>T. mentagrophytes</i>) après incubation (à droite)	190

Liste des tableaux

Tableau 1 : Activités des fractions de <i>P. acutangulum</i> (lot MF2057) sur <i>P. falciparum</i> FcB1	79
Tableau 2 : Activités des fractions de <i>P. acutangulum</i> (lot MF2057) sur <i>P. falciparum</i>	81
Tableau 3 : Comparaison des activités d'extraits de <i>P. acutangulum</i> sur <i>P. falciparum</i>	83
Tableau 4 : Activités des extraits de <i>P. acutangulum</i> (lot MF2176) sur <i>P. falciparum</i> FcB1	84
Tableau 5 : Déplacements chimiques (δ) et couplages homonucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) et hétéronucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) dans l'acétone- d_6 pour la (+)-catéchine (1)	88
Tableau 6 : Déplacements chimiques (δ) couplages homonucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) et hétéronucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) dans le CD_3OD pour la quercitrine-3- O - β -D-xylofuranoside (3)	89
Tableau 7 : Déplacements chimiques (δ) couplages homonucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY et NOESY) et hétéronucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) dans le CD_3OD pour la quercitrine-3- O - β -D-xylopyranoside (reynoutrine) (4)	91
Tableau 8 : Déplacements chimiques (δ) couplages homonucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY et NOESY) et hétéronucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) dans le CD_3OD pour la quercitrine-3- O - α -L-arabinopyranoside (guaijaverine) (5)	93
Tableau 9 : Déplacements chimiques (δ) couplages homonucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY et NOESY) et hétéronucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) dans le CD_3OD pour la quercitrine-3- O - α -L-arabinofuranoside (avicularine) (6)	94
Tableau 10 : Déplacements chimiques (δ) couplages homonucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY et NOESY) et hétéronucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) dans le CD_3OD pour la quercitrine-3- O - α -L-rhamnopyranoside (quercitrine) (7)	95
Tableau 11 : Mesure de l'activité antiplasmodiale et de la cytotoxicité des molécules pures isolées de l'extrait à l'acétate d'éthyle de <i>Psidium acutangulum</i>	96
Tableau 12 : Activités antiplasmodiales des fractions intermédiaires de l'extrait à l'acétate d'éthyle de <i>P. acutangulum</i>	97
Tableau 13 : Concentration et activité antipaludique des constituants de la décoction de tiges de <i>P. acutangulum</i>	98
Tableau 14 : Comparaison des proportions relatives obtenues par GC/MS de 37 constituants communs aux deux lots d'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i>	126
Tableau 15 : Concentrations inhibitrices minimales (CIM en $\mu\text{g/ml}$) pour les deux lots d'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> et pour les molécules majoritaires de ces huiles. Dernière ligne : cytotoxicité sur cellules VERO (CI_{50} en $\mu\text{g/ml}$) pour le lot 2 d'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i>	131
Tableau 16 : Concentration inhibitrices minimales (CIM, $\mu\text{g/ml}$), concentrations inhibitrices fractionnées et indice de CIF pour des combinaisons d'huile essentielle d' <i>Otacanthus azureus</i> et d'antifongiques azolés	137
Tableau 17 : Interprétation qualitative des résultats obtenus pour les huiles essentielles sélectionnées (diamètres des zones d'inhibition de la croissance de levures et de champignons dermatophytes et de levures) pour le test de diffusion en cavité	146
Tableau 18 : Concentrations inhibitrices minimales (CIM en $\mu\text{g/ml}$) pour les huiles essentielles testées	148
Tableau 19 : Conditions expérimentales pour la mesure des pouvoirs rotatoires des molécules pures isolées de l'extrait à l'acétate d'éthyle PSI F de la décoction de <i>P. acutangulum</i>	180
Tableau 20 : Valeurs des scores d'activité antifongique attribués en fonction de la CIM mesurée en $\mu\text{g/ml}$	194

Abréviations

ACP	Analyse en composantes principales
ACT	Artemisin combination therapy (combinaisons entre l'artémisinine et ses dérivés et d'autres médicaments antipaludiques)
AHC	Analyse hiérarchisée des clusters
AFSSAPS	Agence française de sécurité sanitaire des produits de santé
ATCC	American type culture collection
CI ₅₀	Concentration inhibitrice de la croissance de 50 % de la croissance de l'organisme étudié
CIF	Concentrations inhibitrices fractionnées
CIM	Concentration d'inhibition minimale
CLHP	Chromatographie Liquide Haute Performance
CLSI	Clinical and laboratory standards institute
COSY	Correlation spectroscopy
CP	Composante principale
DO	Densité optique
DOSY	Diffusion order spectroscopy
DMSO	Diméthylsulfoxyde
DSDS	Direction de la santé et du développement social
ED ₅₀	Dose à laquelle une substance est pharmacologiquement active sur 50 % de la population exposée (dans le cas des tests de cytotoxicité, dose à laquelle 50% des cellules exposées à cette substance meurent)
EI	Effet inhibiteur
EMEM	Eagle's minimal essential medium
GC/MS	Gaz chromatography / mass spectrometry (chromatographie en phase gazeuse couplée à la spectrométrie de masse)
GPS	Global positioning system
HE	Huile essentielle
GRP	Globule rouge parasite
GRS	Globule rouge sain
HMBC	Heteronuclear multiple bond coherence (gHMBCAD : gradient HMBC with adiabatic pulse)
HMQC	Heteronuclear multiple quantum coherence
HRMS	High resolution mass spectrometry (spectrométrie de masse haute resolution)
HSQC	Heteronuclear single quantum coherence (gHSQCAD : gradient HSQC with adiabatic pulse)
ICIF	Indice de CIF
IEDOM	Institut d'émission des départements d'Outre-Mer
IGN	Institut géographique national
IK	Indice de Kovats
INSEE	Institut national de la statistique et des études économiques
IPP	Isopentenyl diphosphate
IRD	Institut de recherche pour le développement
LC/MS	Liquid chromatography / mass spectrometry (chromatographie liquide couplée à la spectrométrie de masse)
LMGO	Laboratoire de Mycologie de l'Université Fédérale de Goiás
MOPS	Acide 3-(<i>N</i> -morpholino)-propanesulfonique
MTT	Bromure de 3(4,5-diméthylthiazol-2-yl)-2,5-diphényltetrazolium)

NCCLS	National committee for clinical laboratory standards
NEC	Nouvelles entités chimiques
NOE	Nuclear overhauser effect
NOESY	Nuclear overhauser effect spectroscopy
NNISS	National nosocomial infections surveillance system
OMS	Organisation mondiale de la santé
ONF	Office national des forêts
PDA	Potato dextrose agar (dextrose de pomme de terre et agar)
pH	Potentiel hydrogène
PK	Point kilométrique
PO FEDER	Programme opérationnel du fonds européen de développement régional
RN2	Route nationale 2, reliant Cayenne à St Georges de l'Oyapock à la frontière brésilienne
RMN	Résonnance magnétique nucléaire
RPMI	Roswell Park memorial institute medium
SDD	Service départemental de désinfection du Conseil Général de Guyane
SDS	Sodium dodecylsulfate
SH	Sérum humain
SkD	Simalikalactone D
TOCSY	Total correlation spectroscopy
TRAMAZ	Programme de recherche « Médecine Traditionnelle en Amazonie »
UMR	Unité mixte de recherche
UPS	Université Paul Sabatier
UV	Ultra-violet
VIH	Virus de l'immunodéficience humaine
WHO	World health organization

Introduction générale

« *Depuis six mille ans, la guerre / Plaît aux peuples querelleurs, / Et Dieu perd son temps à faire / Les étoiles et les fleurs* ». Victor Hugo était sans doute un peu pessimiste pour ce qui est de l'aspect végétal, car il y a plus de 6 000 ans les plantes étaient déjà utilisées depuis longtemps par les hommes pour se soigner. Dieu n'avait donc pas tout à fait perdu son temps... De ces premières drogues végétales recensées par les Sumériens et les Babyloniens à l'isolement des premiers principes actifs avec les progrès de la chimie aux XVIII^e et XIX^e siècles, l'histoire du rôle thérapeutique des plantes est aussi longue que l'histoire de l'humanité elle-même (Quetin-Leclerc, 2002). Le fondement de la pharmacologie moderne est issu de toutes ces connaissances sur les médecines à base de plantes. Actuellement, environ 25 % des médicaments modernes sont développés à partir de plantes (Liu and Wang, 2008). Entre 1983 et 1994, près de 40 % des nouvelles drogues autorisées à être mises sur le marché aux Etats-Unis étaient dérivées de composés naturels (Simmonds, 2003) et environ 70 % des nouvelles entités chimiques (NEC) décrites entre 1981 et 2006 étaient issues d'études portant sur les produits naturels (Liu and Wang, 2008; Newman and Cragg, 2007). Plusieurs stratégies peuvent être mises en place dans le but d'obtenir des composés actifs d'origine naturelle, ceux-ci pouvant provenir aussi bien de plantes que de champignons ou de bactéries. Les criblages de collections de plantes ou de micro-organismes sont une méthode classique qui a permis par exemple la découverte de la plupart des antibiotiques actuels (Simmonds, 2003). D'autres méthodes comme la chimiotaxonomie, la zoopharmacologie, l'ethnopharmacologie ou plus récemment les stratégies basées sur l'écologie chimique permettent de rationaliser cette recherche. De fait, il est actuellement possible de trouver des informations sur les applications thérapeutiques de plus de 85 000 espèces de plantes (Balunas and Kinghorn, 2005).

L'objectif de cette thèse est de rechercher des substances actives d'origine végétale, qu'il s'agisse de molécules pures ou d'extraits au sens large (préparations phytothérapeutiques ou huiles essentielles), présentant un potentiel pour le développement de nouveaux traitements contre les maladies infectieuses, causées en particulier par des champignons ou des parasites. Ces pathologies représentent effectivement toujours un problème de santé publique majeur malgré les progrès de la médecine, et ce en particulier dans les pays en voie de développement, du fait de la faible disponibilité des traitements et du développement des phénomènes de résistance (Cos *et al.*, 2006). Le travail effectué s'articule selon deux axes : dans un premier temps l'étude de remèdes traditionnels issus de différentes communautés guyanaises et utilisés contre le paludisme, ou plus largement les fièvres, et dans un second temps un criblage d'huiles essentielles issues de la flore amazonienne, testées sur des levures pathogènes et des champignons dermatophytes responsables de mycoses chez l'homme. Pour ce deuxième point, le criblage sera approfondi par une étude plus large des métabolites secondaires rencontrés dans les huiles, afin de tenter d'analyser plus précisément les résultats d'activités biologiques obtenus et de lier ces activités à la composition des huiles essentielles.

Chapitre 1 : « Des plantes, des hommes, des possibilités »*

Historique et avenir des substances naturelles en chimie médicinale

* Source: « Plant, people, possibilities » - Kew Botanical Garden

A. De la plante au principe actif : naissance de la chimie des substances naturelles

L'existence de systèmes de médecine à base de plantes peut être attestée depuis le Paléolithique moyen, il y a près de 60 000 ans, suites aux découvertes effectuées sur le site archéologique de Shanidar IV, en Iraq. Les premières traces écrites témoignant de l'existence de ce type de médecine datent de 2 600 ans avant notre ère. Les Sumériens, installés en basse Mésopotamie, utilisaient des plantes médicinales et aromatiques telles que le cèdre (*Cedrus* spp., Pinaceae), le cyprès (*Cupressus sempervirens* L., Cupressaceae), la myrrhe (*Commiphora* spp., Burseraceae) ou le jus de pavot (*Papaver somniferum* L., Papaveraceae) (Gurib-Fakim, 2006).

Parmi les civilisations anciennes ayant fait grand usage des plantes pour se soigner figurent bien entendu les Chinois et les Egyptiens. Le système de médecine chinoise, basé sur les concepts de *yin* et de *yang*, est supposé dater de plus de 5 000 ans, et a en particulier été décrit par l'empereur Shen Nung en 2 500 avant J.C. (Gurib-Fakim, 2006). De nombreuses connaissances sur les pratiques en vigueur en Egypte antique (*Figure 1*) proviennent quant à elles du papyrus médical Ebers, datant d'environ 1 500 ans avant J.C., et qui recense des informations concernant les maladies et leurs remèdes. D'autres témoignages ont également été retrouvés tels que ce diagnostic préconisant « Fais qu'il s'occupe et qu'il se fasse, de sorte qu'il soit sur l'heure bien portant » (Erman et Ranke, 1994).



Figure 1 : Arbres à encens ramenés lors de l'expédition organisée par Hatchepsout au pays de Pount, un des remèdes utilisé en Egypte antique (temple de Deir el-Bahari)

Par la suite, les plantes ont continué à être utilisées en médecine, et l'un des praticiens les plus célèbres de l'époque grecque reste Hippocrate. Il recommandait par exemple des remèdes à base de plantes aromatiques administrés sous forme de fumigations, frictions et bains, notamment en cas d'accès hystérique, lorsque « les matrices vont vers le foie [...] une fumigation fétide pour le nez, aromatique pour les matrices. [...] Après deux jours d'intervalle, injection aromatique dans les

matrices » (Hippocrate). Il prescrit également l'utilisation de baies de myrte, de raclures de lotus pour la confection de cataplasmes, ou encore des fumigations de « myrrhe calonienne imprégnée d'eau de rose » ; enfin, « la malade prendra cinq grains noirs de pivoine, en y mêlant du castoreum dans du vin parfumé ». En Europe, l'utilisation très ancienne des plantes médicinales a été illustrée par la découverte sur le corps d'Ötzi, l'homme des glaces retrouvé dans les Alpes suisses en 1991, de fruits de *Piptoporus betulinus* (Fr.) Karst. (Polyporaceae), connus pour contenir des résines toxiques et de l'acide agarique, qui sont des purgatifs puissants, ainsi que des huiles possédant des propriétés antibiotiques. Ce remède lui permettait sans doute, il y a près de 5 300 ans, de lutter contre les parasites intestinaux mis en évidence dans son organisme (Capasso, 1998).

En 77 après J.C., Dioscoride, médecin, botaniste et pharmacologue grec réalise l'ouvrage « *De materia medica* », qui recense l'utilisation médicale de 1 600 remèdes utilisés par les Grecs, les Romains et d'autres cultures de l'Antiquité, la majorité de ces produits étant d'origine végétale. Ce livre est resté la référence concernant les préparations phytothérapeutiques en Europe pendant plus de 1 000 ans (Gurib-Fakim, 2006). Parmi les plantes décrites, 54 ont été reprises dans la liste des plantes essentielles de l'OMS en 1978. Par la suite, Galien, Celse ou Pline l'Ancien poursuivent et approfondissent ce travail (Quetin-Leclerc, 2002). La civilisation byzantine recueille ensuite, du Ve au XVe siècle, l'art de guérir connu pendant l'antiquité grecque et romaine, et le transmet aux Arabes, ainsi qu'à l'Occident chrétien. Grâce aux échanges continus, à partir de 1096 lors de la première croisade, entre l'Orient et l'Occident, l'Europe peut s'approvisionner en épices, aromates et autres matières premières parfumées. Celles-ci sont en majorité utilisées de façon médicale, afin de lutter en particulier contre les épidémies, mais possèdent un large champ d'emplois. Hildegarde de Bingen, religieuse allemande du XIIe siècle, recommande par exemple de « prendre de la rose et à peine moins de sauge [...] en effet la sauge apaise et la rose réjouit » afin de se débarrasser de la « bile noire » responsable en particulier de la mélancolie et des accès de colère (Pernoud, 1994).

L'étape suivante a lieu au XVIe siècle, avec le travail de Paracelse, qui introduit la notion de principe actif en posant les bases de la pharmacie expérimentale. Les premiers composés seront extraits des plantes aux XVIIIe et XIXe siècles grâce aux progrès de la chimie, permettant par exemple l'isolement de la morphine à partir de l'opium produit par les plants de *Papaver somniferum* L. (Papaveraceae) en 1806 par Sertürner (Liu et Wang, 2008) (*Figure 2*) ou celui de la quinine à partir du quinquina par les pharmaciens parisiens Pelletier et Caventou en 1820 (Quetin-Leclerc, 2002). Ces premières démonstrations du fait qu'un seul composé chimique est capable d'expliquer l'activité d'une drogue à base de plante ont initié la chimie des substances naturelles. La pharmacognosie apparaît comme discipline à part entière à cette époque, définie pour la première fois par J.A. Schmidt (Samuelsson et Bohlin, 2009).

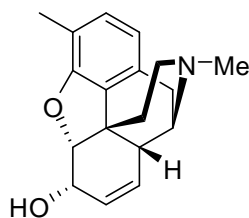


Figure 2 : Structure de la morphine (à gauche) et fleur de *Papaver sp.* (à droite, photographie G. Houël)

En 1818 était enfin publiée la première pharmacopée française, le « *Codex medicamentarius seu Pharmacopae gallica* » (Urdang, 1951) et en 1821 par Megendie un formulaire médical contenant seulement une liste de substances pures, ouvrant la voie au remplacement des remèdes phytothérapeutiques par des molécules isolées (Gilani et Atta-ur-Rhaman, 2005). Ces avancées ont permis le développement de drogues à la qualité constante et au dosage précis, posant les premières pierres de l'industrie pharmaceutique et révolutionnant la médecine en contribuant à un accroissement exceptionnel de la durée de vie moyenne dans le monde occidental, passant de 40 ans au début du XXe siècle à près de 80 ans actuellement (Hartmann, 2007; Li et Vederas, 2009).

A partir de cette étape, plusieurs moyens d'utiliser les plantes à des fins thérapeutiques se sont développés (Fabricant et Farnsworth, 2001):

- comme matière première afin d'en extraire des composés actifs pouvant être utilisés directement sous forme de médicament (par exemple les molécules extraites de la digitale (*Figure 3*), le taxol, la



Figure 3 : Fleurs de digitale

vincristine ou la morphine déjà citée plus haut),

- pour l'obtention de nouvelles structures, ou têtes de série, susceptibles d'être modifiées par exemple par hémisynthèse (comme dans le cas de l'oxycodon à partir de la morphine, ou le taxotère à partir du taxol),

- comme sources d'inspiration pour la synthèse de nouveaux composés ou pour la mise au point de bibliothèques pour le criblage haut-débit,

- dans le cadre d'une préparation phytothérapeutique, pouvant être associée à un usage traditionnel.

Ces différentes démarches seront illustrées et discutées dans les paragraphes suivants.

B. De la plante au médicament : développement de l'industrie pharmaceutique

Actuellement, les molécules utilisées pour la fabrication de médicaments peuvent être issues de la synthèse chimique, d'hémisynthèse permettant d'obtenir des composés plus actifs ou présentant moins d'effets secondaires que la molécule naturelle de départ, ou par extraction dans des cas plus rares (artémisinine d'*Artemisia annua* L. (Asteraceae) (Kindermans *et al.*, 2007), D-tubocurarine de la liane tropicale *Chondrodendron tomentosum* Ruiz & Pav. (Menispermaceae), réserpine de *Rauwolfia* spp. (Apocynaceae) (Gurib-Fakim, 2006)) (Figure 4).

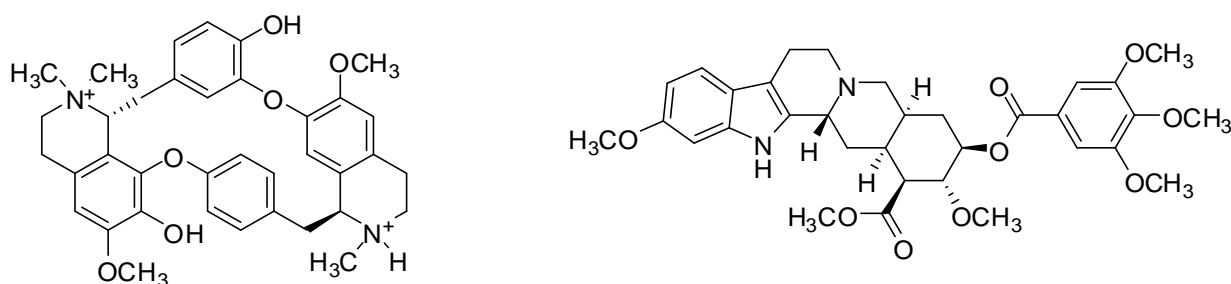


Figure 4 : Structures de la D-tubocurarine (relaxant musculaire issu de *Chondrodendron tomentosum* Ruiz & Pav.) (à gauche) et de la réserpine (agent hypotenseur extrait de *Rauwolfia* spp.) (à droite)

Un des exemples les plus connus de ce processus allant de la plante au médicament est celui des molécules dérivées de l'if. Le paclitaxel (Figure 5), isolé d'écorces de *Taxus brevifolia* Nutt. (Taxaceae) en 1967 par Wall et Wani, présente une activité anticancéreuse en interagissant avec la tubuline cellulaire pour promouvoir l'assemblage des microtubules et inhiber la mitose. Cependant, son extraction est difficile, les rendements sont faibles, et l'exploitation de la ressource naturelle mettrait en danger l'espèce. En effet, pour obtenir 1 900 g de taxol, 27 300 kg d'écorce issue de 6 000 arbres avaient été utilisés, or la masse de molécule nécessaire à la poursuite des essais cliniques aurait été de 25 kg (Cordell, 1995). D'autre part, au vu de la complexité de la structure, une synthèse totale de la molécule en vue de sa commercialisation n'est pas réalisable pour des questions économiques. Le potentiel anticancéreux de cette molécule nouvelle ne put donc pas être totalement exploité au départ, et les études *in vivo*, toxicologiques et éventuellement les essais cliniques ne purent être réalisés à ce moment-là. Cependant une seconde molécule, la desacétyl-baccatine II (Figure 5), fut ensuite isolée des aiguilles de *Taxus baccata* L. (Taxaceae), un if européen. Elle possède un squelette et une stéréochimie identique au paclitaxel, mais sans présenter d'activité anticancéreuse. Mais l'hémisynthèse du paclitaxel à partir de cette molécule, mise au point par Pierre Potier dans les années 80, devint alors possible, d'autant plus que la ressource végétale est cette fois

renouvelable et la récolte non destructive pour l'espèce (Quetin-Leclerc, 2002). C'est cependant suite à une seconde méthode d'hémisynthèse, mise au point par Robert Holton et permettant d'obtenir le paclitaxel avec un rendement deux fois plus important à partir d'aiguilles de l'if européen ou des espèces asiatiques que cette molécule a ensuite pu être commercialisée sous le nom de Taxol®, pour traiter notamment les cancers du sein et des ovaires, mais également certains cancers du poumon ou de la prostate (Frisvold et Day-Rubenstein, 2008; Itokawa *et al.*, 2008; Wall et Wani, 1996). La découverte d'un champignon endophyte de l'écorce de *Taxus*, *Taxomyces andreanae* Strobel, A. Stierle, D. Stierle & W.M. Hess, produisant de petites quantités de Paclitaxel même après avoir été séparé de l'arbre – phénomène dû à un transfert de gène de l'arbre au microorganisme – a permis de mettre à jour une nouvelle voie de production de cette molécule (Gurib-Fakim, 2006).

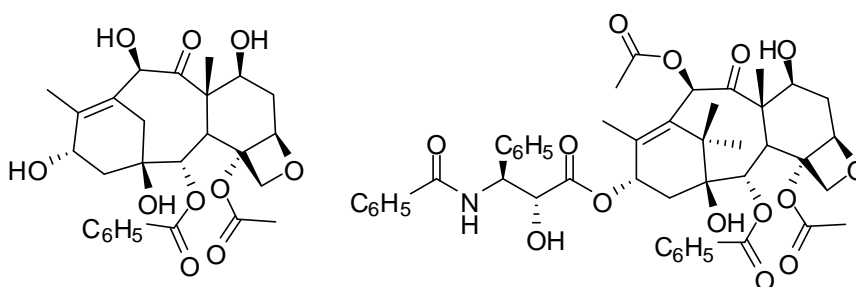


Figure 5 : *Taxus* sp. (photographie A. Rodrigues) et desacétyl-baccatine II (molécule de gauche) et paclitaxel (Taxol®) (molécule de droite)

Un autre exemple, mettant cette fois en lumière l'intérêt de l'étude des remèdes traditionnels, est celui de l'écorce de saule (*Salix* sp., Salicaceae). Les premières recommandations d'usage afin de lutter contre la douleur remontent à l'Antiquité. Au XIXe siècle, un principe actif, le salicoside (Figure 6), fut isolé. Cette molécule est un précurseur de l'alcool salicylique, puis de l'acide du même nom, qui se forment dans l'organisme. La découverte de la synthèse totale de l'acide salicylique permit ensuite le remplacement de la molécule initiale. Enfin, afin d'éviter les effets irritants de ce produit, celui-ci fut remplacé par un dérivé synthétisé en 1899 par Hoffmann, l'acide acétylsalicylique (Figure 6), ou aspirine® (Quetin-Leclerc, 2002).

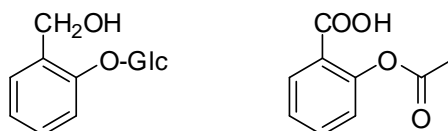


Figure 6 : Structures du salicoside (à gauche) et de l'acide acétylsalicylique (à droite)

Une étude extensive de la littérature disponible sur ce sujet, comme celle effectuée par Newmann et Cragg en 2007 montre clairement l'importance du rôle joué par les substances d'origine naturelle (qu'elles soient des produits naturels *stricto sensu* ou des dérivés hémisynthétiques) ainsi

que par celles inspirées des molécules naturelles (molécules issues de synthèses totales mais avec un pharmacophore issu d'un produit naturel, ou la catégorie des « natural products mimic » définie par les auteurs), et ce malgré la diminution du nombre de programmes de recherches basés sur la chimie des substances naturelles menés par des entreprises pharmaceutiques (Angell, 2004). Ainsi, dans le domaine des actifs antiparasitaires, seules 28,5 % des molécules approuvées entre 1981 et 2006 étaient d'origine purement synthétique. Dans le cadre des recherches de produits anticancéreux menées sur la même période, 88 % des nouvelles entités chimiques décrites étaient d'origine naturelle, ou dérivées ou inspirées de molécules naturelles. Enfin, dans le cas des molécules antibactériennes, le pourcentage de substances issues de la synthèse n'était que de 23,5 %. Certains domaines restent cependant dominés par les molécules synthétiques, comme les substances antifongiques (78,6 %), les antihistaminiques, les diurétiques ou les hypnotiques (Newman et Cragg, 2007).

Cependant, le processus d'obtention d'un médicament à partir d'une plante reste complexe, avec de nombreuses étapes telles que l'identification du composé d'intérêt (tests *in vitro* et *in vivo*, fractionnement bioguidé), l'optimisation de ce composé (hémisynthèse, chimie combinatoire et médicinale), le développement du produit (études toxicologiques, pharmacologiques, pharmacocinétiques...) pour obtenir un candidat médicament, et enfin les essais cliniques. La durée de ce processus peut-être estimée à 10 ans environ, et son coût à plus de 800 millions de dollars (Balunas et Kinghorn, 2005).

C. Le cas particulier des médicaments à base de plantes

Dans la législation française sont distinguées trois catégories de produits : le médicament, le médicament à base de plantes et la substance végétale¹. Le Code de la Santé Publique distingue de plus dans le cadre des plantes médicinales, aromatiques et de leurs dérivés en l'état ou sous forme de préparation : dans un premier cas les plantes en l'état, sous monopole pharmaceutique (Art. L4211-1) et dans un second cas les préparations magistrales ou officinales (Art. L5121-1). L'AFSSAPS (Agence Française de Sécurité Sanitaire des Produits de Santé, anciennement Agence du Médicament) tient à jour une Liste des Plantes Médicinales faisant partie intégrante de la Pharmacopée française 10ème édition. Cette liste est divisée en deux parties : les « Plantes médicinales utilisées traditionnellement » constituent la Liste A, qui comportait 333 références en 2009, et les « Plantes médicinales utilisées traditionnellement en l'état ou sous forme de préparation

¹ Article L.5111-1 du Code de la Santé Publique modifié par la loi 2007-248 du 26/02/2007, Directive 2001/83/CE, Directive 2004/24/CE arrêté du 6 mai 2008, Directive 2001/83/CE.

dont les effets indésirables potentiels sont supérieurs au bénéfice thérapeutique attendu » représentent la liste B, constituée de 115 plantes en 2009.² Dans la suite de ce travail, le terme « traditionnel » sera ainsi employé pour décrire l'emploi des plantes médicinales spécifiques à certaines cultures même s'il reste quelque peu restrictif, ne prenant pas suffisamment en compte le fait que ces cultures évoluent perpétuellement et s'adaptent aux modifications de leur environnement (Heinrich *et al.*, 2009).

Certaines plantes sont en effet toujours actuellement utilisées sous forme d'extraits, la plus connue d'entre elles étant sans doute le *Ginkgo biloba* L. (Ginkgoaceae), cité dans le recueil « Shen Nung Pen T'sao » datant d'environ 2 500 ans avant Jésus-Christ. La médecine chinoise utilise les feuilles de *Ginkgo biloba* en décoctions et en emplâtres, dans des indications traditionnelles très variées : toux, asthme, tuberculose pulmonaire, stabilisation de la spermatogenèse, arrêt des leucorrhées... En emplâtre, les feuilles bouillies sont toujours utilisées contre les engelures, ce qui est à rapprocher de ses propriétés vasoactives mises en valeur en Europe (Michel, 1986). L'extrait de *Ginkgo biloba* constitue un exemple de principe actif d'origine végétale, maintenant standardisé par l'industrie pharmaceutique. Dans le cas du ginkgo, il existe un « extrait complet », également appelé « extrait brut » ou « extrait simple », contenant la plupart des constituants dans les mêmes proportions que le matériau de départ. Le produit ainsi obtenu est un mélange complexe de principes actifs, de constituants inertes de la plante et dans certains cas, de quelques constituants susceptibles de causer des effets secondaires. Un extrait de ce type contient généralement de 2 à 4 % de glycosides de flavonols. Un second type d'extrait, l'« extrait enrichi » ou « extrait spécial » a permis le développement en Europe de phytomédicaments à base de ginkgo. Il est standardisé à 24 % d'hétérosides flavonoïdiques et contient également des proanthocyanidines ainsi que des ginkgolides et du bilobalide (Drieu, 1986; Sticher, 1993; Sticher *et al.*, 2000). Il est actuellement considéré que les ginkgolides sont les composés responsables de l'activité de l'extrait sur l'inhibition de l'aggrégation plaquettaire ainsi que des effets sur le métabolisme et le débit sanguin cérébral, et que le rôle anti-oxydant et anti-oedémateux de l'extrait provient de la présence des flavonoïdes, mais l'étude des mécanismes d'action reste difficile du fait de l'existence d'interactions entre ces molécules et les autres composés présents dans le mélange, ce qui explique pourquoi l'extrait reste toujours utilisé de nos jours (Quetin-Leclerc, 2002). Une des caractéristiques des drogues végétales est en effet le fait qu'un remède peut montrer plusieurs activités différentes par des interactions avec des cibles moléculaires diverses, mais également en agissant avec des systèmes biologiques liés afin de produire des effets de synergie (Liu et Wang, 2008). Des méta-analyses ont également montré un

² <http://www.afssaps.fr/Activites/Pharmacopee/Qu-est-ce-que-la-Pharmacopee-francaise/%28offset%29/1>, consulté le 20/08/2010

effet faible mais cependant significatif de l'extrait de *Ginkgo biloba* sur des patients atteints de la maladie d'Alzheimer (Goldman, 2001).

Un des avantages des médicaments à base de plantes – qui restent cependant des médicaments à part entière – et des substances végétales est le fait que, étant utilisés depuis un temps très long, leurs applications thérapeutiques ont déjà été largement comprises du fait de l'expérience. Le point crucial dans le développement de ce type de produits reste donc la standardisation de la substance végétale, afin de garantir l'activité et l'innocuité des préparations grâce à des études approfondies aussi bien chimiques – par exemple l'étude des profils métaboliques des plantes, afin d'identifier les constituants bioactifs, les composés minoritaires, mais aussi d'améliorer les connaissances sur l'efficacité, la sécurité et la complexité de ce type de préparation – que pharmacologiques (en particulier l'étude des mécanismes de synergie). D'autres points à prendre en compte dans ces processus de standardisation sont également les conditions de croissance, de récolte et de stockage de la plante, aussi bien que l'influence du climat ou du cycle biologique de la plante au moment de sa récolte (Liu et Wang, 2008). Dans le cas de l'utilisation de médicaments à base de plantes, il est également important de ne pas négliger, comme pour tout médicament, les possibles interactions entre les divers composés de la plante – même s'il ne s'agit pas des principes actifs – et d'autres médicaments qui seraient utilisés par le patient. Ainsi, une étude menée sur des patients utilisant du millepertuis (*Hypericum perforatum* L., Clusiaceae), recommandé en particulier pour le traitement de la dépression) a montré que la préparation réduisait le taux d'absorption de la digoxine d'environ 25 % et augmentait la métabolisation d'autres substances comme la cyclosporine, la warfarine et les contraceptifs oraux (Goldman, 2001; Gurib-Fakim, 2006).

Concernant plus particulièrement les plantes originaires d'Outre-Mer, il existe en dehors de la Pharmacopée française une Pharmacopée caribéenne non officielle qui recense plus de 140 plantes utilisées traditionnellement³. Cependant, les plantes issues de l'Outre-Mer peuvent être incluses dans la liste des plantes médicinales de la Pharmacopée française. Vingt-et-une d'entre elles y figurent, dont en particulier *Senna alata* (L.) Roxb., Fabaceae (2008) et *Lippia alba* (Mill.) N.E. Br. ex Britton & P. Wilson, Verbenaceae (2009)⁴. Ces travaux s'insèrent dans les initiatives soutenues par le Ministère de l'Outre-Mer, en particulier concernant le développement des thérapeutiques traditionnelles, afin de poursuivre la reconnaissance et l'officialisation des plantes ultramarines (Afssaps, 2008). Les études relatives aux plantes médicinales, et plus particulièrement aux remèdes traditionnels, s'inscrivent donc également dans une démarche plus large de valorisation, de conservation et d'exploitation raisonnée

³ http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/e8cf66590c626ef0f2146e80eb85f1bb.pdf, consulté le 29/03/2011

⁴ http://www.afssaps.fr/var/afssaps_site/storage/original/application/e8cf66590c626ef0f2146e80eb85f1bb.pdf, consulté le 20/01/2011

d'un patrimoine naturel, tout en gardant comme objectif de possibles développements de formulations phytothérapeutiques accessibles au plus grand nombre.

D. Métabolites secondaires des végétaux : quelles stratégies de recherche de nouvelles molécules ?

1. Les substances naturelles : d'anciens déchets de la biosynthèse devenus des composés irremplaçables

Les métabolites secondaires se définissent comme les molécules produites par des organismes vivants (plantes, champignons, bactéries...) ne jouant pas de rôle direct pour les fonctions vitales de l'organisme, c'est-à-dire la nutrition, la croissance, et la reproduction (*Figure 7*).



Figure 7 : Des molécules responsables de la couleur des plantes, mais pas seulement...

Ce phénomène a été reconnu par Julius Sachs en 1873 et précisé par Albrecht Kossel en 1891. En 1888, Ernst Stahl avait de plus mis en évidence le fait que ces composés pouvaient servir de défense aux plantes contre les escargots. Mais depuis cette époque et pendant de longues années, ces molécules avaient cependant été considérées comme sans intérêt, jusqu'à ce que les progrès de l'écologie chimique remettent en lumière dans les années 60, avec les travaux de Fraenkel et Ehrlich, l'importance de leur rôle. Les métabolites secondaires interviennent en particulier dans l'évolution, la survie des espèces, ainsi que dans les interactions entre individus de la même espèce ou d'espèces différentes, par leur implication dans les phénomènes de défense, de symbiose ou de pollinisation par exemple. Du fait du nombre très élevé d'espèces des différents règnes, et du nombre de combinaisons possibles pour que ces espèces interagissent, la chimiodiversité issue du vivant semble donc difficile à quantifier. Actuellement, le nombre de structures répertoriées comme appartenant à cette classe est de près 200 000 (Hartmann, 2007; Pan *et al.*, 2010; Theodoridis *et al.*, 1998; Verpoorte, 1998; Wink, 2003).

Ces métabolites peuvent être classés en plusieurs grandes familles (*Figure 8*), dont les plus importantes en termes de nombre de structures connues sont les composés phénoliques (tanins, flavonoïdes...), les composés azotés, avec en particulier les alcaloïdes, et les composés terpéniques. Ils sont globalement issus de « briques » de bases identiques, en particulier le bloc C₂ (unité acétate, issue de l'acide pyruvique via l'acétyl-CoA), qui conduit par exemple aux acides gras ou aux polycétides, le bloc C₅ (unité isoprénique dont le précurseur est l'isopentenylidiphosphate ou IPP), qui sert de base aux terpènes et aux stéroïdes, et le bloc C₉, dérivé de la phénylalanine ou de la tyrosine, qui conduit à la classe des phénylpropanoïdes. Si la première voie de biosynthèse, celle de l'acétate, est en particulier très développée chez les micro-organismes, et si la seconde se retrouve largement chez de nombreux êtres vivants, la troisième est plus spécifique des plantes et conduit en particulier à la lignine, aux lignanes, ainsi qu'aux flavonoïdes et anthocyanines. En complément, des voies de biosynthèse permettent en impliquant le métabolisme de l'azote par le biais des acides aminés d'aboutir à des composés tels que les alcaloïdes (Croteau *et al.*, 2000; Dewick, 2009; Gurib-Fakim, 2006).

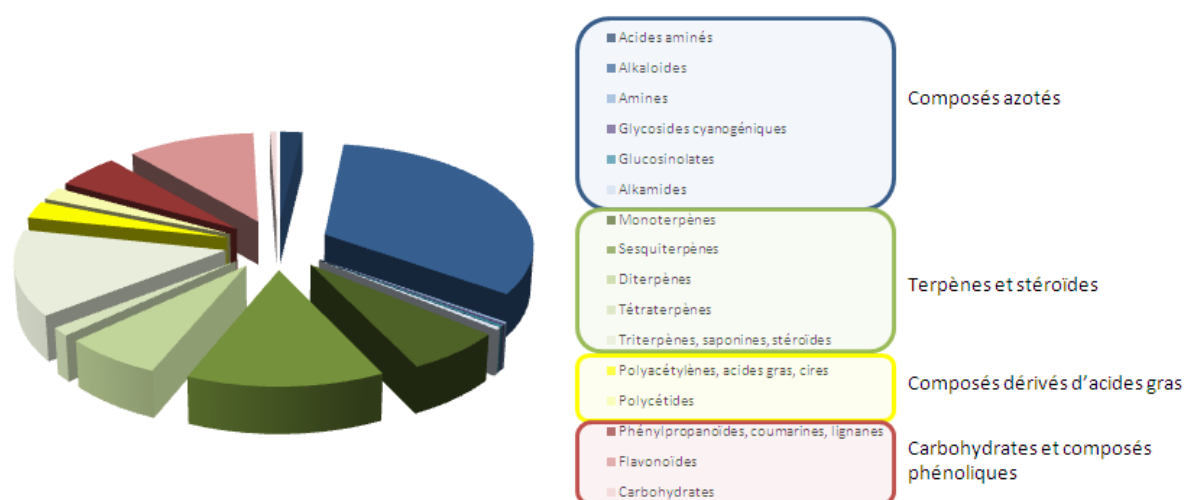


Figure 8 : Diversité structurale des métabolites secondaires des plantes – d'après Wink, M., *Phytochemistry* 64, p.4, 2003

Selon Beghyn *et al.* (Beghyn *et al.*, 2008), un des facteurs expliquant le grand intérêt porté à ces métabolites secondaires par des chimistes travaillant dans différents domaines est le fait que ces molécules allient à la fois des propriétés biologiques uniques et des structures complexes. Ces structures peuvent même être qualifiées de « privilégiées », c'est-à-dire, selon la définition d'Evans *et al.* (Evans *et al.*, 1988), qu'elles sont capables de faire office de ligands pour plus d'un type de récepteur du fait de l'association de pharmacophores variés à la périphérie d'un squelette de base. Ces composés sont donc de bons candidats pour la recherche de médicaments.

2. Présentation des stratégies de recherche

La pharmacognosie, reconnue comme discipline pharmaceutique en 1815 par Seidler, a été définie par l'*American Society of Pharmacognosy* comme « l'étude des propriétés physiques, chimiques, biochimiques et biologiques de médicaments ou médicaments potentiels, éventuellement d'origine naturelle, aussi bien que la recherche de nouvelles substances actives d'origine naturelle » (Balunas et Kinghorn, 2005). Pour cette recherche, plusieurs critères peuvent être utilisés afin de sélectionner des plantes susceptibles de contenir des métabolites secondaires présentant une activité, parmi lesquels la chimiotaxonomie (établissement de rapports entre la composition chimique des espèces et leur classification systématique), l'ethnobotanique médicale (études des plantes utilisées de façon traditionnelle à des fins thérapeutiques), l'écologie chimique (étude du rôle des composés chimiques dans la médiation des interactions biotiques) ou la bioinspiration (étude des fonctions d'une molécule dans son environnement et application de ces propriétés dans un autre domaine) (Verpoorte, 1998). Ces trois dernières approches seront présentées plus en détails dans les paragraphes suivants. En effet, lors d'une collecte effectuée au hasard, les plantes de petite taille ou peu abondantes sont rarement récoltées, car non disponibles en quantité suffisante pour alimenter des collections destinées au criblage (Lewis et Elvin-Lewis, 1995). Ce biais peut-être contourné grâce aux stratégies citées ci-dessus, des espèces d'intérêt majeur pour des études orientées vers des applications thérapeutiques étant ainsi plus susceptibles d'être sélectionnées.

Ethnobotanique

Le terme « ethnobotanique » a été employé pour la première fois en 1895 par Harschberger, botaniste, écologue et taxonomiste américain, définissant ainsi « l'étude des plantes utilisées par les peuples primitifs et aborigènes » (Valadeau, 2010). Cette définition s'est élargie et précisée dans les années qui ont suivi, passant par une volonté de connaissance exhaustive du mode de vie des populations concernées et des effets de l'environnement végétal sur celui-ci, pour aboutir à la définition de Schultes en 1967 d'« étude des relations entre l'homme et la végétation ambiante » (Gurib-Fakim, 2006). L'ethnobotanique médicale couvre donc un champ particulier de cette discipline très vaste.

Des travaux effectués par différents auteurs entre 1985 et 1990 et résumés par Lewis et Elvin-Lewis ont à l'époque permis de mettre en évidence qu'une sélection des espèces effectuée selon des critères basés sur l'ethnobotanique médicale ont cinq fois plus de chances d'aboutir à la découverte d'un principe actif d'intérêt thérapeutique qu'un criblage de plantes effectué au hasard. Cette estimation a été confirmée par une étude menée sur des plantes utilisées de façon traditionnelle pour le traitement d'un virus considéré comme ancêtre du VIH et testées sur le virus VIH. A l'issue de ces

tests, 71,4 % des extraits ont démontré une activité *in vitro* (Lewis et Elvin-Lewis, 1995). De même, une étude menée sur l'évaluation de l'activité antifongique de plantes issues d'Amérique latine (Svetaz *et al.*, 2010) a mis en évidence un taux de succès supérieur pour les espèces sélectionnées sur la base de critères ethnopharmacologiques par rapport à des espèces sélectionnées au hasard (40,3 % des espèces actives sur au moins une souche testée dans le premier cas, contre 21,3 % dans le second). Les auteurs ont également mis en évidence des activités plus importantes (valeurs des CIM – concentration d'inhibition minimale – plus faibles) vis-à-vis des champignons dermatophytes dans le cas des plantes utilisées de façon traditionnelle. Le fait que la sélection des plantes sur la base de données ethnobotaniques augmente le pourcentage de chance d'aboutir à un extrait actif est reconnu et démontré dans de nombreuses publications (Cordell, 1995; Fabricant et Farnsworth, 2001).

Parmi les exemples les plus connus de médicaments issus d'études ethnobotaniques figurent bien sûr la quinine ou l'artémisinine. De même, la galanthamine (*Figure 9*) (ou galantamine, commercialisée sous le nom de Reminyl®) est une molécule, approuvée en 2001 pour le traitement de la maladie d'Alzheimer, découverte grâce à des études ethnobotaniques – passant d'une utilisation pour la diminution des douleurs nerveuses au possible traitement de la poliomyélite chez les enfants puis conduisant à la découverte de son activité anticholinestérase – et isolée au départ de *Galanthus woronowii* Losink. (Amaryllidaceae) en Russie dans les années 1950 (Heinrich et Teoh, 2004).

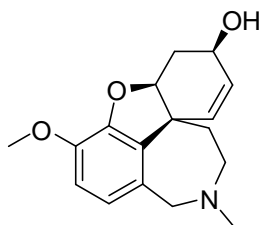


Figure 9 : Structure de la galanthamine

Enfin, l'ethnobotanique peut non seulement conduire à la découverte de molécules actives, mais, comme dans le cas cité plus haut du *Ginkgo biloba*, aboutir à la mise sur le marché d'extraits totaux ou de préparation phytothérapeutiques. Des études ethnopharmacologiques ont par exemple permis d'aboutir à la mise sur le marché au Nigéria d'une préparation botanique à base d'un mélange de plantes, Hemoxin®, qui a démontré son efficacité lors d'essais cliniques dans des cas d'anémie falciforme (Wambebe *et al.*, 2001).

Certains anthropologues soulignent le fait que l'aspect ethnographique est parfois négligé dans le cas d'études ethnopharmacologiques (méconnaissance des populations dont les remèdes sont étudiés, imprécisions dues aux problèmes de langue...) (Gertsch, 2009). Afin que l'orientation

des collectes suivant un critère ethnobotanique soit effectuée de façon précise, il faut donc particulièrement veiller à cet aspect, surtout lors des enquêtes menées sur le terrain.

Ecologie chimique et bioinspiration

Une des stratégies actuelles, de plus en plus largement utilisée, pour la découverte de nouveaux composés se base sur l'écologie chimique. Il s'agit d'exploiter la capacité des plantes ou des micro-organismes à produire des molécules biologiquement actives du fait de la pression de l'environnement (*Figure 10*). Les métabolites produits par les organismes vivants ont évolués, *via* la sélection naturelle, afin d'agir de façon physiologique ou écologique sur le maintien de l'organisme. Leur caractéristique principale est donc leur grande plasticité et diversité qui permet à l'individu concerné de s'adapter de façon flexible aux demandes d'un environnement en évolution constante. Ainsi, une plante ayant réussi à se maintenir dans son environnement aura a priori sélectionné les meilleures voies de biosynthèse permettant de produire les métabolites secondaires adaptés. (Hartmann, 2007; Simmonds, 2003).



Figure 10 : Exemples d'interactions plantes-insectes

Ce concept de la recherche de nouvelles substances actives à partir d'études réalisées en écologie chimique peut être décrit sous le nom de bioinspiration. Cette dénomination a été créée au début des années 2000 par des chercheurs du domaine des matériaux (Dujardin et Mann, 2002; Zhou, 2000), décrivant le fait que la compréhension de l'organisation des atomes et des macromolécules du vivant pourrait aider à la mise au point de nouvelles voies de préparation de matériaux innovants.

Dans le domaine de la pharmacognosie, ce concept a par exemple été illustré par des études ayant abouti à la découverte sur la peau de certaines espèces de grenouilles de peptides antibiotiques puissants, pouvant détruire la membrane bactérienne sans favoriser le développement de résistances, et actuellement testés dans le cadre d'études précliniques (Pan *et al.*, 2010). Les auteurs citent également le cas de protéines antivirales trouvées dans des mouches, qui pourraient s'avérer être de bonnes candidates pour la recherche de nouveaux antiviraux. Ces recherches ont été

menées au départ en partant du postulat que ces deux espèces animales – grenouilles et mouches – vivant dans des environnements hostiles et ne mourant cependant pas d'infections (alors qu'une mouche peut par exemple être porteuse de plusieurs millions de bactéries), des composés devaient avoir été peu à peu développés par leur métabolisme pour leur permettre de résister aux virus et aux bactéries. Des composés antifongiques peuvent également être mis en évidence en s'inspirant de cette démarche. Il est par exemple connu depuis longtemps que l' α -tomatidine (Figure 11), un glycoalcaloïde stéroïdique produit par la tomate, joue un rôle de composé de défense de la plante, et il a été démontré récemment que l'aglycone de cette molécule inhibe la biosynthèse de l'ergostérol – composant majoritaire de la membrane plasmique – chez les levures (Bednarek et Osbourn, 2009; Simons *et al.*, 2006).

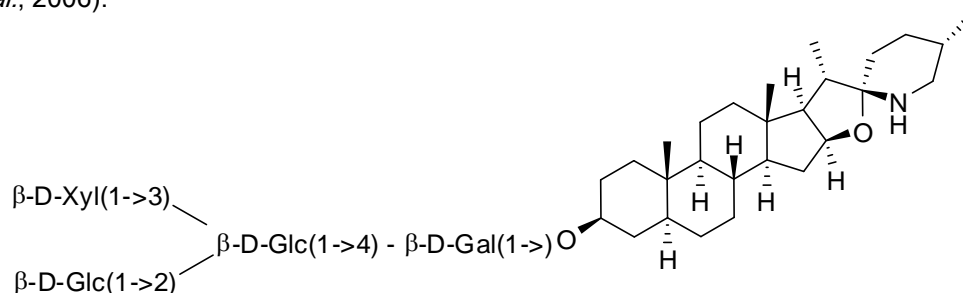


Figure 11 : Structure de l' α -tomatidine

Des résultats validant cette démarche ont également été obtenus dans le cadre d'une thèse de doctorat (Rodrigues, 2010). En effet, il a été démontré dans cette étude que des composés responsables de la durabilité naturelle des bois tropicaux – résistance aux champignons lignivores et aux termites – présentent également des activités intéressantes sur les mycoses humaines. En particulier, le rubrénilide et le rubrynilide isolés à partir d'un extrait de bois de *Sextonia rubra* (Mez.) Van der Werff (Lauraceae) (Figure 12) ont montré des activités parfois meilleures que celle du fluconazole, un antifongique de référence, aussi bien sur des champignons dermatophytes que sur des levures. Ces composés, bien que cytotoxiques à une concentration équivalente à celle requise pour atteindre l'activité fongicide (tests effectués sur des cellules tumorales KB), mais ne présentant aucune cytotoxicité sur cellules musculaires, pourraient donc devenir de bonnes « têtes de série » pour la découverte de nouvelles molécules antifongiques (Rodrigues *et al.*, 2010).

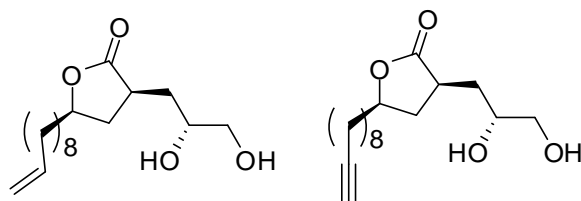


Figure 12 : Grignon au sol en forêt guyanaise (photo de droite) - rubrénilide (molécule de gauche) et rubrynilide (molécule de droite) isolés de l'extrait à l'acétate d'éthyle du bois de *S. rubra* (photographie A. Rodrigues)

E. Quel avenir pour la chimie des substances naturelles dans le développement de nouveaux médicaments ?

Malgré le succès de la recherche de substances naturelles à visée thérapeutique et le nombre toujours important de molécules d'origine naturelle ou dérivées de molécules naturelles mises sur le marché, il faut cependant constater une baisse d'intérêt de l'industrie pharmaceutique pour l'exploration des substances bioactives d'origine végétale : à la fin des années 1980, près de 80 % des substances pharmacologiquement actives étaient d'origine végétale ou composées d'analogues synthétisés à partir de principes actifs végétaux, et ce chiffre a chuté pour atteindre environ 20 % en 2007. Trois points principaux peuvent en particulier expliquer cette situation : le fait que le criblage de collections de ressources naturelles ne rentre pas forcément dans les critères des stratégies modernes de haut-débit, des limitations techniques empêchant d'identifier un nombre suffisant de composés nouveaux ayant des activités intéressantes, mais également les questions de propriété intellectuelle concernant les ressources végétales, en particulier dans le cas des plantes utilisées de façon traditionnelle (Li et Vederas, 2009; Simmonds, 2003).

Les métabolites secondaires d'origine naturelle (végétale, marine, fongique ou bactérienne) possèdent en effet des caractéristiques rendant leur étude difficile :

- une incompatibilité des métabolites secondaires sous forme d'extrait brut avec les techniques de criblage haut-débit, du fait de la présence de nombreuses molécules, dont certaines, comme les tanins, peuvent fréquemment donner dans certaines conditions d'analyse des faux positifs (Kingston, 2011),
- des structures souvent complexes, avec de nombreux atomes d'oxygène et/ou centres asymétriques, comme illustré plus haut par l'exemple du taxol (Clardy et Walsh, 2004),
- des quantités très faibles de principe actif, avec souvent des mélanges de molécules de structures proches, rendant les étapes d'extraction et de purification longues et coûteuses, et pouvant également conduire à des effets antagonistes ou synergiques, comme mis en évidence dans le cas de certaines bactériocines (peptides antimicrobiens issus des bactéries) par Garneau *et al.* (Garneau *et al.*, 2002)
- une possible variation de la concentration en principe actif dans le matériel de départ, en fonction par exemple des conditions environnementales (sol, climat), de la saison de récolte, de l'état de maturation de la plante ou du stade de développement de l'organisme⁵ (Assad *et al.*, 1997; Dubey *et al.*, 2004),

⁵ WHO monograph on good agricultural and collection practices (GACP) for *Artemisia annua* L., <http://apps.who.int/medicinedocs/documents/s14074e/s14074e.pdf>, consulté le 22/01/2011

- un accès à la ressource en quantité suffisante parfois difficile : cette question se pose autant pour les plantes dont sont issues des molécules actives (voir l'exemple du taxotère) que pour celles utilisées de façon traditionnelle. Selon Brower (Brower, 2008), 15 000 des 50 à 70 000 espèces de plantes médicinales actuellement estimées seraient menacées d'extinction. De plus, les espèces déjà incluses dans des filières de plantes médicinales sont fréquemment collectées dans leur biotope naturel, sans mise en culture préalable, ce qui conduit dans certains cas à une raréfaction voire à une disparition progressive de la ressource. Cela a en particulier été mis en évidence pour *Rhodiola crenulata* (Hook. f. & Thomson) H. Ohba et *Cordyceps* spp. en Chine (Mercan *et al.*, 2007),
- un accès à la ressource rendu également difficile du fait des législations en vigueur concernant l'accès à la biodiversité (propriété intellectuelle, accès aux ressources génétiques, connaissance traditionnelle, partage équitable des bénéfices) (Calderon *et al.*, 2009),
- et enfin une étude pouvant parfois apparaître a priori comme une science un peu désuète face à l'aspect « high-tech » de la synthèse automatisée à haut débit par exemple, pouvant rebuter les financeurs.

De plus, l'intérêt parmi les entreprises pharmaceutiques pour la recherche de nouveaux traitements contre les maladies infectieuses a nettement diminué ces dernières années, or dans ce domaine les molécules actives étaient fréquemment des composés d'origine naturelle. Ce facteur explique donc également la baisse relative de la part de métabolites secondaires ou de leurs dérivés hémisynthétiques dans le domaine pharmaceutique (Beghyn *et al.*, 2008; Koehn *et al.*, 2005).

Cependant, un regain d'intérêt pour la chimie des substances naturelles dans le développement de nouveaux médicaments reste possible. En effet, de nombreuses ressources naturelles restent encore inexploitées, avec moins de 15 % des végétaux supérieurs testés pour une activité biologique donnée, et surtout de nombreux micro-organismes, en particulier les bactéries (cyanobactéries, myxobactéries...), non encore étudiés du fait d'une mise en culture permettant la réalisation des essais biologiques restée pour le moment sans succès. Parmi les substances naturelles les plus intéressantes découvertes ces dernières années, certaines proviennent en particulier d'une ressource devenue récemment accessible, les champignons endophytes, comme les guanacastépènes, isolés grâce à des tests antibiotiques à partir d'un champignon endophyte du Costa Rica (Brady *et al.*, 2001) (*Figure 13*). De plus, le taux de succès lors du criblage de molécules d'origine naturelle reste plus qu'encourageant : dans le seul cas des polycétides (famille de l'érythromycine et de l'amphotéricine), 20 substances ont abouti à la formulation de médicaments sur 7 000 testées, soit un taux de succès de 0,3 % contre en moyenne moins de 0,001 % de réussite dans le cas d'un criblage haut-débit effectué sur des bibliothèques de composés synthétiques (Li et Vederas, 2009).

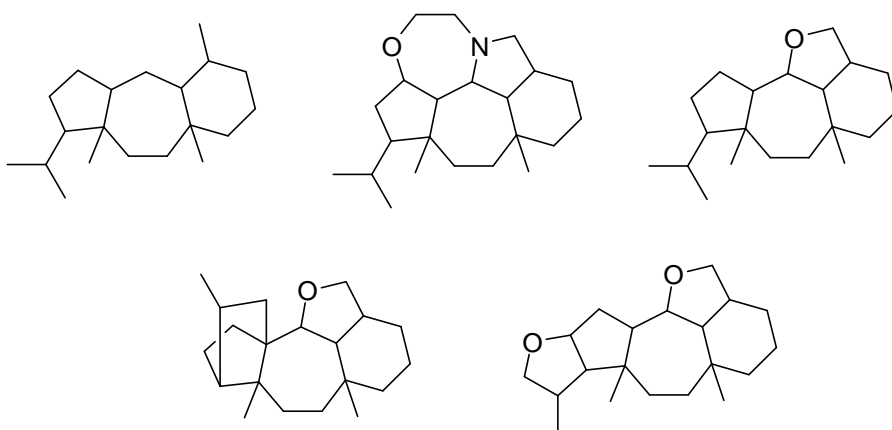


Figure 13 : Structures cycliques produites par le champignon endophyte CR115 pour la biosynthèse des guanacastépènes – d'après Brady *et al.*, *J. Am. Chem. Soc.* 2001, 123, 9900-9901

Les difficultés techniques citées plus haut peuvent également être surmontées par la mise en place de méthodes adaptées et de nouvelles stratégies de recherche (Koehn et Carter, 2005). Parmi ces stratégies se trouvent en particulier les « criblages intelligents », par exemple en utilisant des cibles résistantes aux antibiotiques connus pour éviter un « bruit de fond » (Baltz, 2008), l'intervention de la robotique par couplage des techniques de séparation par CLHP, d'analyse par spectrométrie de masse ou RMN et de criblage haut-débit (Corcoran et Spraul, 2003; Isbell *et al.*, 2002; Kingston, 2011; Shapiro et Gounarides, 1999), la métabolomique (Verpoorte *et al.*, 2007) ou le développement d'outils biologiques, comme la métagénomique, qui étudie les gènes et leur fonction dans des échantillons provenant directement de l'environnement, en particulier dans le cas de l'étude des micro-organismes du sol. Cette approche permettrait, couplée à des techniques de criblage automatisé, de tester pour une activité biologique de nombreux micro-organismes non encore étudiés (Handelsman *et al.*, 1998; Mocali et Benedetti, 2010). Ce type d'outils et de stratégies permettent ainsi à la chimie des substances naturelles de s'inscrire clairement dans le cadre des sciences de pointe, ouvertes vers l'avenir.

Une dernière approche faisant partie de ces évolutions de la chimie des substances naturelles est la production des métabolites secondaires d'intérêt par l'expression de la voie de biosynthèse de ces molécules au sein de bactéries ou de levures (le « metabolic engineering »), un des exemples les plus connus de cette stratégie étant l'utilisation de la bactérie *E. coli* afin d'obtenir l'acide artémisinique, permettant ensuite d'aboutir en 3 étapes d'hémisynthèse à l'artémisinine (Keasling, 2008). Cette orientation de la biosynthèse de certains métabolites peut également être effectuée dans le cas des cultures de cellules des plantes elles-mêmes (Hartmann, 2007).

Enfin, les avancées en chimie organique de synthèse et la meilleure compréhension des voies de biosynthèse des molécules naturelles ont permis la construction de bibliothèques de composés basées sur des squelettes de produits naturels, ce qui met en évidence que ces métabolites secondaires peuvent devenir, tout comme les composés synthétiques, de bons points de départ pour la recherche de composés bioactifs (Beghyn *et al.*, 2008; Clardy et Walsh, 2004; Ortholand et Ganesan, 2004). La mise au point de ce type de bibliothèques peut également être facilitée par le développement d'outils d'analyse et de génération d'hypothèses tels que la classification structurale des produits naturels (SCONP) faite par Koch *et al.*, qui organise une représentation sous forme d'arbre des différents squelettes de base des molécules naturelles (Koch *et al.*, 2005).

Tous ces éléments, combinant ressources inexploitées et progrès techniques, montrent que la chimie des substances naturelles garde toute sa place dans le processus de la découverte de nouveaux produits d'intérêt thérapeutique, comme cela a été largement démontré et argumenté dans la très complète revue de Newman et Cragg (Newman et Cragg, 2007).

F. Plantes et hommes en Guyane française

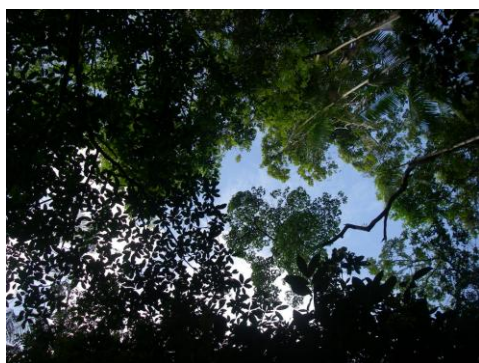
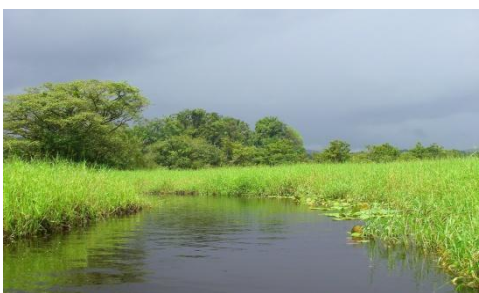
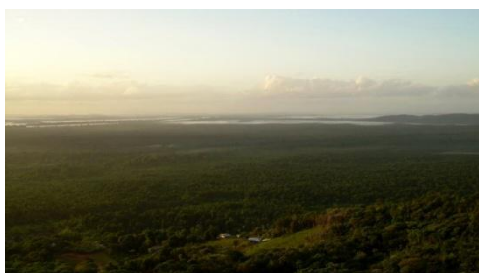


Figure 14 : Ecosystèmes de Guyane française.
De haut en bas : Village de Ouanary, estuaire de l'Oyapock – Petit inselberg des Nouragues – Marais de Kaw – Vers la canopée

La Guyane française est un département d'Outre-Mer d'une superficie de 83 846 km² selon l'IGN. Elle se trouve au Nord-Est du continent sud-américain, intégrée dans l'ensemble amazonien, et plus particulièrement dans le « bouclier guyanais » - ou province floristique des Guyanes - situé entre l'Orénoque à l'ouest et l'Amazone à l'est. Les pays voisins sont le Surinam à l'ouest et le Brésil au sud et à l'est, ses frontières étant respectivement délimitées par les fleuves Maroni et Oyapock ainsi que par les Monts Tumuc-Humac. L'année y est divisée en deux saisons : une saison sèche d'août à novembre et une saison humide de décembre à juillet, avec une humidité relative moyenne variant de 80 à 90 % suivant la saison, et des températures stables autour de 28°C (IEDOM, 2010; Vigneron *et al.*, 2005).

La forêt tropicale humide couvre en Guyane près de 8 millions d'hectares, soit plus de 90 % du territoire. D'autres types de végétations sont également présents en Guyane, comme les savanes, marais, mangroves ou savanes-roches par exemple (Figure 14). Le nombre d'espèces végétales vasculaires recensées sur le plateau des Guyanes serait de 8 à 10 000, dont 5 200 espèces de plantes supérieures recensées en Guyane française, parmi lesquelles plus de 1 200 espèces d'arbres (De Granville, 2008; IEDOM, 2010), contre environ 80 espèces autochtones d'arbres en France métropolitaine (Brunaux, 2004). Si l'on regarde le nombre d'espèces d'arbres qui composent un hectare de forêt, la Guyane française se montre comme la région la plus riche parmi la province des Guyanes, avec parfois plus de 200 espèces par hectare dans certaines zones géographiques (Sabatier, 2002). Un réseau d'espaces naturels protégés

existe en Guyane française, avec en particulier des réserves naturelles (Grand-Connétable, Nouragues, Trinité, Kaw-Roura et Amana), une réserve naturelle volontaire (réserve Trésor, sur la montagne de Kaw), le Parc Naturel Régional de Régina-Roura et Mana-Awala, et depuis 2007 le Parc

Amazonien de Guyane, avec 3,4 millions d'hectares divisés en une zone de cœur de 2 millions d'hectares et une zone de libre adhésion (Lochon et Linarès, 2004)⁶.

Du fait de son histoire (racines amérindiennes, colonisation et esclavage, ruée vers l'or, bagne...) et de sa situation géographique (immigration haïtienne, brésilienne et surinamaïse), la Guyane française se caractérise par une mosaïque de groupes ethniques et culturels (*Figure 15*). Sa population est passée de 23 000 habitants en 1946 à près de 229 000 en 2009 d'après une estimation de l'INSEE (IEDOM, 2010). Elle est constituée de personnes d'origine créole, amérindienne, bushinenge, métropolitaine, hmong, chinoise, brésilienne ou haïtienne.

Les Amérindiens sont restés la population majoritaire jusqu'au XVIII^e siècle, et sont issus de trois groupes linguistiques distincts : les Tupi-Guarani (Wayampi, Emerillons sur le Haut-Oyapock (Camopi, Trois-Sauts) et le Haut-Maroni), les Arawak (Palikur et Arawak, sur la bande côtière et les zones du

Bas-Maroni et Oyapock) et les Karib (Kali'na et Wayana, dans l'ouest de la Guyane pour les premiers et sur le Haut-Maroni pour les seconds) (Grenand et Grenand, 2008; Vigneron *et al.*, 2005). Les Bushinenge – ou Noirs Marrons – sont les descendants des esclaves d'origine africaine qui fuyaient au XVIII^e siècle les habitations des planteurs hollandais au Surinam actuel. Cette population est constituée de quatre groupes – Samaraka, Ndjuka, Boni (ou Aluku) et Paramaka – essentiellement présents au Surinam mais également en Guyane française, dans l'ouest du département à l'origine, puis de plus en plus dans les bourgs côtiers de la bande littorale (Grenand et Grenand, 2008; Vigneron *et al.*, 2005). La majeure partie de la population guyanaise est enfin constituée par les Créoles, descendants métis des esclaves africains et des colons métropolitains.

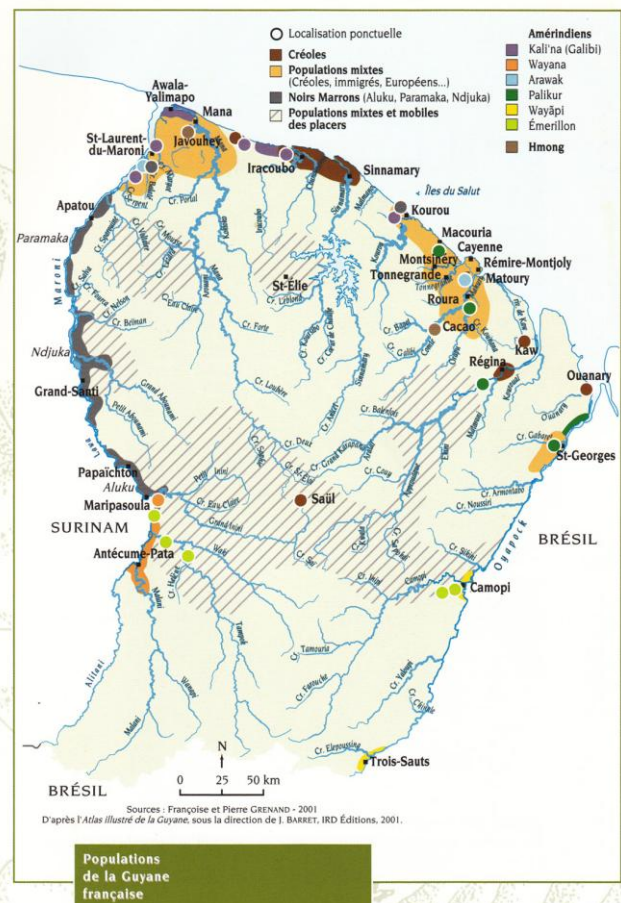


Figure 15 : Carte des groupes humains de la Guyane française -
source : *Pharmacopées traditionnelles de Guyane française*,
Grenand P. *et al.*, IRD Ed., 2004, 816 p.

⁶ <http://www.parc-guyane.gf>, consulté le 23/01/2011

Du fait de ses origines métissées, la population créole a mis au point une pharmacopée issue à la fois de connaissances européennes, d'usages importés des Antilles, de conceptions de la médecine d'origine africaine et de découvertes locales (Grenand *et al.*, 2004). Les connaissances médicales des Bushinenge sont elles aussi a priori d'origines diverses, du fait de la faible ancienneté relative de la présence de ces populations (moins de trois siècles) en Guyane française⁷. Parmi les groupes amérindiens, les pharmacopées ne sont pas forcément homogènes, avec possiblement des origines très diverses : représentation strictement amérindienne du monde mais remèdes parfois empruntés aux Créoles ou Brésiliens pour les Palikur, pharmacopée issue de l'application de connaissances anciennes des Tupi, en les transposant cependant aux espèces guyanaises pour les Wayãmpi (Grenand *et al.*, 2004). Au total, plus de 500 plantes médicinales sont recensées en Guyane, la très grande majorité d'entre elles n'étant pas inscrite à la Pharmacopée française⁸. Dans le cas spécifique de ce département, il ne faut donc pas parler d'une mais des pharmacopées traditionnelles. Leur usage reste très familial, les consommateurs procédant par culture ou cueillette dans leurs propres jardins, ou par échange ou don (Fleury *et al.*, 2004). Le recours aux médecines traditionnelles reste toujours important : plus de 60 % des personnes interrogées sur les traitements utilisés contre le paludisme font par exemple intervenir des plantes (Vigneron *et al.*, 2005). Les pharmacopées à base de plantes sont donc toujours bien vivantes dans ce département multiculturel d'Amazonie française.

⁷ Ethnopharmacologie guyanaise : des populations en contact permanent avec la nature, Sauvain, M., consulté sur <http://www.mpl.ird.fr/suds-en-ligne/fr/plantes/richeesse/popula02.htm#suds> le 23/01/2011

⁸ *Senna alata* et *Lippia alba*, inscrites à la Pharmacopée, font par exemple partie des plantes médicinales de Guyane, la première étant utilisée en décoction comme remède aux douleurs cardiaques par les Créoles, et la seconde comme fébrifuge et vermifuge chez les Amérindiens (Grenand *et al.*, 2004).

Chapitre 2 : Faut-il ajouter un crabe ?

Analyse de préparations phytothérapeutiques à base de Quassia amara L. (Simaroubaceae) et Psidium acutangulum DC. (Myrtaceae) utilisées en Guyane française pour une indication antipaludique

« Pour terminer sur une note plus légère, une dernière question : quelle est votre anecdote phytochimique favorite ? »

Deux ethnobotanistes travaillaient à l'étude du remède d'un chamane d'Afrique de l'Ouest s'étant révélé très efficace pour diminuer la glycémie. Ils avaient réalisé un travail approfondi sur des combinaisons variées des trois plantes constituant le remède sans pour autant réussir à en reproduire les effets. Retournant auprès du chamane après avoir échoué à démontrer, pour le mélange qu'il leur avait indiqué, le moindre effet positif pour le traitement du diabète, ils lui demandèrent de voir comment il préparait le remède. Le chamane mit à bouillir les plantes, et, juste à la fin de la préparation, y ajouta un crabe. « Qu'est ce que c'est que ça ? » demandèrent les scientifiques. Le chamane répondit qu'il s'agissait assez visiblement d'un crabe. Les chercheurs protestèrent en disant que jamais le crabe n'avait été mentionné dans la recette initiale. Le chamane sourit alors poliment et souligna le fait que la question posée concernait les plantes utilisées dans la recette, question à laquelle il avait répondu ! Le remède amélioré s'avéra actif une fois de retour au laboratoire. »

Traduction tirée de (Plotkin, 2001)

A. Le paludisme

1. Présentation du paludisme : du miasme des marais au cycle complexe de *Plasmodium*

Depuis son apparition, le paludisme a tué ou handicapé plus de personnes que « tous les fléaux, toutes les guerres et toutes les automobiles » (Gurib-Fakim, 2006). Cette maladie infectieuse, endémique dans près de 100 pays dont la majorité se situe en Afrique sub-saharienne (Garcia, 2010), touche actuellement plus de 200 millions de personnes et aurait causé en 2009 près de 781 000 décès, la population à risque représentant près de la moitié de la population mondiale (environ 3 milliards de personnes)⁹. Le paludisme est une maladie ancienne dont on croyait à l'origine qu'elle était due aux miasmes provenant des marais. Il fallu attendre 1880 et Charles Laveran pour que la présence de parasites dans les cellules sanguines des malades soit mise à jour, et presque 20 ans de plus pour que le moustique soit reconnu comme le vecteur de cette maladie, par Ross en 1897 pour le paludisme aviaire, et par Grassi *et al.* entre 1898 et 1900 pour sa forme humaine, transmise par les moustiques du genre *Anopheles*. Ce n'est enfin qu'en 1947 que Shortt et Graham démontrèrent l'existence d'une phase de division dans le foie précédant le développement du parasite dans le sang chez les primates, et isolèrent peu de temps après des formes exo-erythrocytaires de *P. vivax* chez des malades humains (Cox, 2010).

⁹ WHO World malaria report 2010, http://whqlibdoc.who.int/publications/2010/9789241564106_eng.pdf, consulté le 22/01/2011

Le parasite, du genre *Plasmodium* – identifié en 1907 (Cox, 2010) – et dont 172 espèces ont été décrites, infecte aussi bien les oiseaux, les reptiles ou les mammifères. Seules quatre espèces de *Plasmodium* sont rencontrées chez l'homme, chacune causant des formes cliniques différentes : *P. falciparum*, *P. vivax*, *P. malariae* et *P. ovale* (Baird, 2005). *P. falciparum*, rencontré dans les régions tropicales et sub-tropicales est le parasite responsable de la forme mortelle du paludisme chez l'homme, en raison des complications cérébrales redoutables qu'il génère (Hunt *et al.*, 2006). *P. vivax* est la seconde espèce la plus rencontrée à la surface du globe, aussi bien dans les zones tropicales et sub-tropicales que tempérées, et possède le taux de morbidité le plus élevé. Il était par exemple responsable d'environ 80 % des cas de paludisme recensés au Brésil en 2001 (Kretzli *et al.*, 2001). Ce parasite est à l'origine d'une forme récurrente de paludisme, dont les manifestations cliniques vont d'asymptomatiques à sévères, pouvant même conduire à la mort (Miyata *et al.*, 2011). *P. malariae* et *P. ovale* sont moins fréquemment rencontrés que les deux espèces précédemment citées. La première, présente dans les zones tempérées et sub-tropicales, est responsable de la « fièvre quarte » survenant toutes les 72 heures, avec des rechutes possibles plus de vingt ans après l'infection. La seconde, principalement rencontrée en Afrique tropicale et dans quelques îles du Pacifique Sud, dont les manifestations sont proches de celles associées à *P. vivax*, cause des accès de « fièvre tierce » (toutes les 48 heures), forme moins grave de l'infection, mais pouvant survenir sous forme de rechutes 4 à 5 ans après la première manifestation (Garcia, 2010). En 2004 l'implication d'une cinquième espèce, *P. knowlesi*, dans des cas de la maladie chez l'homme, a été confirmée. Le premier cas de paludisme chez l'homme dû à ce parasite, responsable de l'infection chez certaines espèces de macaques, avait été mis en évidence en 1965 (Jongwutiwes *et al.*, 2004; Singh *et al.*, 2004).

Le cycle du parasite est complexe et comprend donc un cycle asexué chez l'homme et un cycle sexué chez le moustique (*Figure 16*). L'infection commence lorsque les sporozoïtes, forme infectante du parasite, sont injectés dans l'organisme humain lors d'un repas sanguin de l'anophèle femelle infectée (Scott, 2007). Ils migrent alors rapidement vers le foie où ils colonisent les cellules hépatiques dans lesquelles se produit une phase de multiplication asexuée ou cycle schizogonique exo-érythrocytaire. La division des sporozoïtes donne rapidement naissance à des milliers de nouvelles formes parasitaires, les mérozoïtes. Ceux-ci sont libérés lors de l'éclatement des cellules hépatiques et gagnent la circulation sanguine. Le second cycle schizogonique, ou cycle érythrocytaire, débute donc (Cox, 2010). Un cycle parallèle (dormant) de schizogonie a également lieu dans le foie dans le cas de *P. vivax* et *P. ovale*. Les parasites à ce stade de développement sont appelés hypnozoïtes (Garcia, 2010). Les mérozoïtes libérés dans le flux sanguin vont ensuite pénétrer activement à l'intérieur des globules rouges et s'y multiplier (Cox, 2010). Durant la phase dite anneau et lorsque le trophozoïte est mature, le parasite consomme l'hémoglobine de la cellule hôte jusqu'à occuper entièrement l'érythrocyte (Leete et Rubin, 1996), conduisant au stade schizontes, à partir

desquels seront produits de nouveaux mérozoïtes. Libérés dans la circulation sanguine, ces derniers infectent à leur tour de nouveaux globules rouges (Arnot et Gull, 1998; Scott, 2007). C'est l'éclatement des érythrocytes qui est responsable de la plupart des symptômes caractéristiques de la maladie (fièvre et frissons) (Scott, 2007). Des gamétocytes se forment à partir de certains mérozoïtes à l'intérieur des globules rouges, et s'ils sont ingérés par le moustique pourront perpétuer le cycle sexué (Garcia, 2010; Leete et Rubin, 1996). Dans l'estomac des moustiques ces gamètes fusionnent et conduisent à la formation d'un ookinète qui pénètre dans la paroi du tube digestif pour former un oocyste. Celui-ci produit alors des sporozoïtes, qui migrent vers les glandes salivaires du moustique (Cox, 2010; Leete et Rubin, 1996; Robert et Boudin, 2003; Scott, 2007).

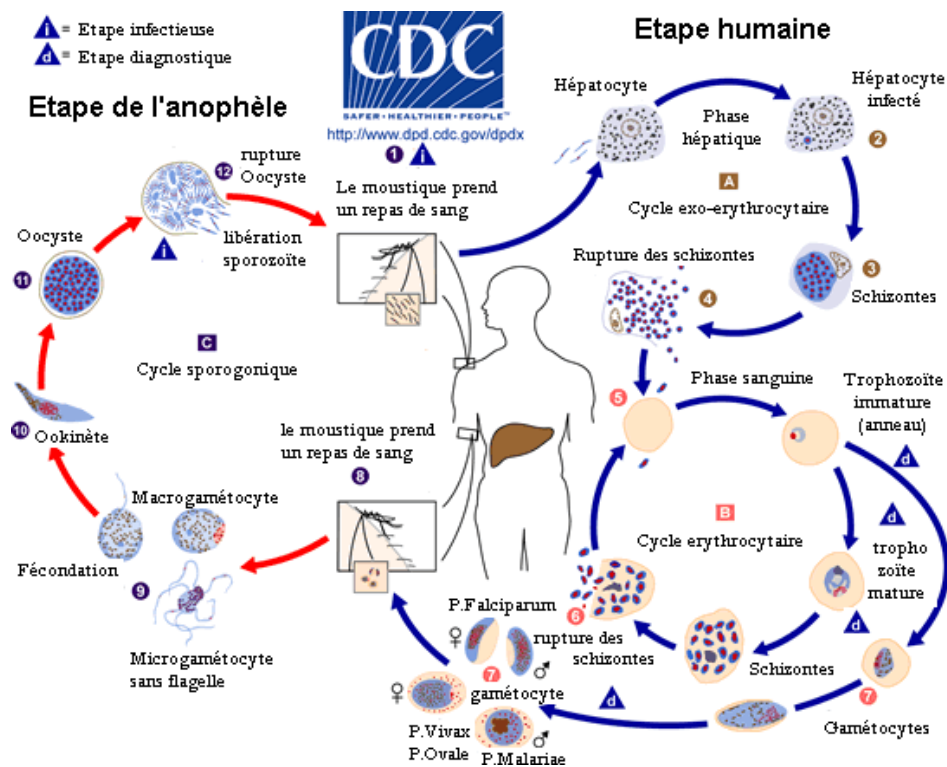


Figure 16 : Cycle biologique de *Plasmodium*. Source: CDC.

Les médicaments antipaludiques peuvent agir à différents stades du cycle : les schizonticides hépatiques – cas par exemple de la primaquine – luttent contre les stades asexués du parasite se développant dans le foie. Ils évitent ainsi des rechutes dues à une persistance du parasite dans cet organe. Les schizonticides actifs au niveau des cellules sanguines, tels que la quinine ou la chloroquine, empêchent les manifestations cliniques de la maladie. Enfin, les gametocytocides – notamment les associations artémether-luméfantrine ou artésunate-méfloquine – éliminent ou stérilisent les formes sexuées dans la circulation sanguine, empêchant l'infection ultérieure du moustique et la transmission de la maladie. Des sporontocides existent également, agissant cette fois sur la forme du parasite se développant dans le moustique (primaquine, association sulfadoxine et

pyriméthamine, ainsi que certaines fluoroquinolones non commercialisées) (Baird, 2005; Robert et Boudin, 2003).

2. Les traitements curatifs

Parmi les plus anciens remèdes utilisés contre les fièvres en général et le paludisme en particulier se trouvent deux plantes, le quinquina et *Artemisia annua* L. (Asteraceae), qui sont aujourd'hui encore à la base des traitements les plus efficaces contre cette parasitose.

L'utilisation du quinquina fut redécouverte au XVII^e siècle par des missionnaires envoyés au Pérou, remarquant que les Indiens Jivaro semblaient moins affectés par cette maladie, et attribuant cet effet à l'écorce d'un arbre, le Quina, qui macérée dans l'eau chaude permettait de soigner la fièvre (Butler *et al.*, 2010). Quatre espèces de ces arbres de la famille des Rubiaceae, dont le genre fut ensuite officiellement nommé par Linné *Cinchona*, ont été découvertes vers le milieu du XVIII^e siècle suite à l'expédition de Jussieu et de La Condamine, dont *C. officinalis* L., l'espèce utilisée traditionnellement. La poudre d'écorce de quinquina fut alors rapportée en Europe, où le premier alcaloïde des quinquinas, la cinchonine, fut isolé en 1811 par Gomes (Pierre, 1971), suivi en 1820 par la quinine, principe actif utilisé rapidement sous sa forme purifiée pour traiter les accès palustres. Cette molécule a ensuite permis de développer plusieurs dérivés comme la méfloquine et l'halofantrine (amino-alcools). Des substituts synthétiques comme la chloroquine ou l'amodiaquine (4-aminoquinoléines) (*Figure 17*) permettent également de traiter ou de prévenir le paludisme avec moins d'effets secondaires et plus d'efficacité (Gurib-Fakim, 2006; Lewis et Elvin-Lewis, 1995; Quetin-Leclerc, 2002; Wainwright et Amaral, 2005).

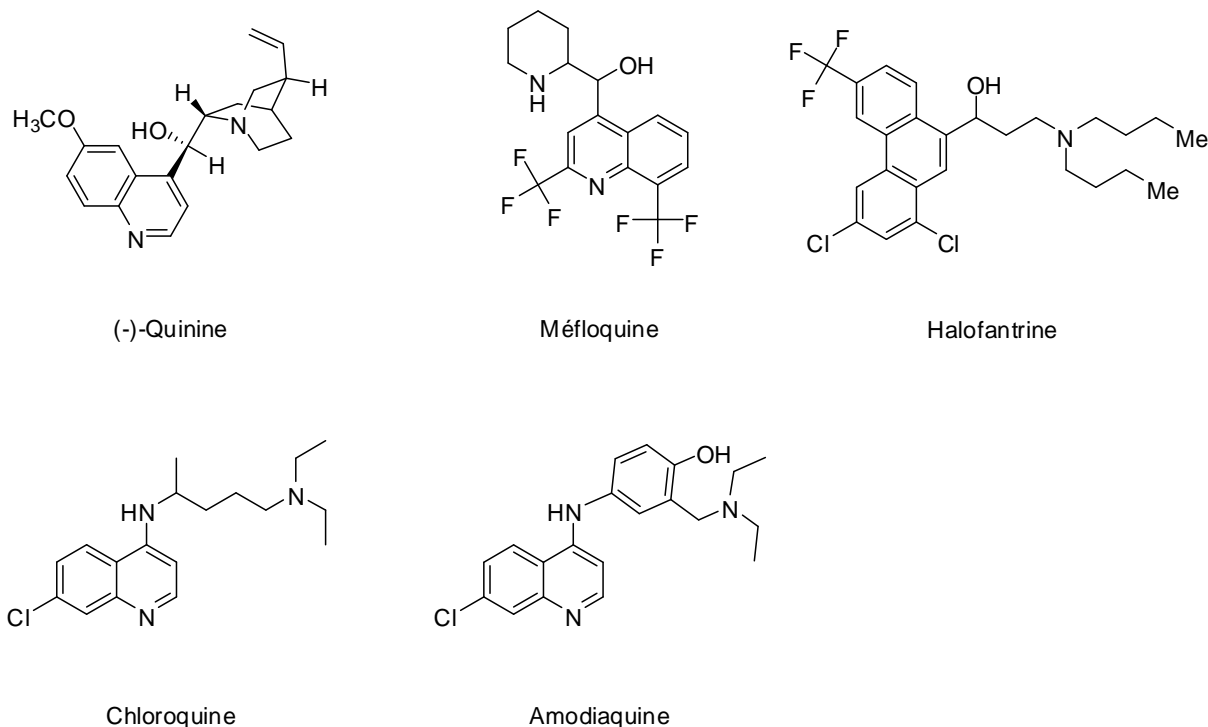


Figure 17 : Structures de la quinine et dérivés

Cependant à l'heure actuelle la plupart de ces molécules autrefois largement utilisées ne sont plus aussi efficaces pour lutter contre cette maladie du fait du développement des résistances de certaines souches de *Plasmodium*, et principalement *P. falciparum*, vis-à-vis des 4-aminoquinolines de synthèse, et en particulier la chloroquine. Le nombre des pays dans lesquels le paludisme est endémique et où des zones de résistance ont été détectées s'élevait il y a quelques années à plus de 60 (Lewis et Elvin-Lewis, 1995). Ce phénomène de résistance, pouvant de façon générale être issu de mutations génétiques du parasite mais aussi dû à une mauvaise utilisation des antipaludiques (automédication abusive, mauvaise observance), à une indisponibilité des médicaments efficaces (rôle crucial du prix des remèdes) ou à la consommation de contrefaçons sous-dosées, facilitant la sélection de souches résistantes (Baird, 2005; Dondorp *et al.*, 2010; Pradines *et al.*, 2010), a donc conduit à la recherche de nouvelles molécules antimalariques possédant des modes d'action différents (Butler *et al.*, 2010; Gurib-Fakim, 2006).

Les parties aériennes séchées d'*Artemisia annua* L., ont été utilisées en Chine depuis l'Antiquité pour traiter les fièvres et le paludisme. Le principe actif, l'artémisinine, une lactone sesquiterpénique, en a été isolée en 1972, dans le cadre d'un projet mené par des scientifiques chinois pour le développement de nouveaux actifs antipaludiques à destination de l'armée, testée à large échelle en Chine en 1974, et sa structure chimique élucidée en 1979. Cette même année le

bilan des résultats obtenus pour l'artémisinine en tant que principe actif antipaludique fut repris par deux spécialistes anglais, qui, en collaboration avec les équipes chinoises poursuivirent les essais, rendus cruciaux du fait du développement de souches résistantes aux dérivés de la quinine (Butler *et al.*, 2010; Quetin-Leclerc, 2002; Yiqing, 2009). L'activité antiplasmodiale de cette molécule est due en particulier au pont endo-péroxyde présent dans cette molécule. Cette lactone sesquiterpénique est extrêmement efficace contre les souches multi-résistantes de *Plasmodium* spp., mais son approvisionnement reste délicat, et elle est inaccessible pour des questions de coût à la plupart des malades du paludisme. A partir de l'artémisinine ont été développés des dérivés hémisynthétiques : l'artéméther, l'artéether et l'artésunate de sodium (*Figure 18*), molécules largement utilisées dans les zones impaludées, en particulier l'Inde (Itokawa *et al.*, 2008; Keasling, 2008).

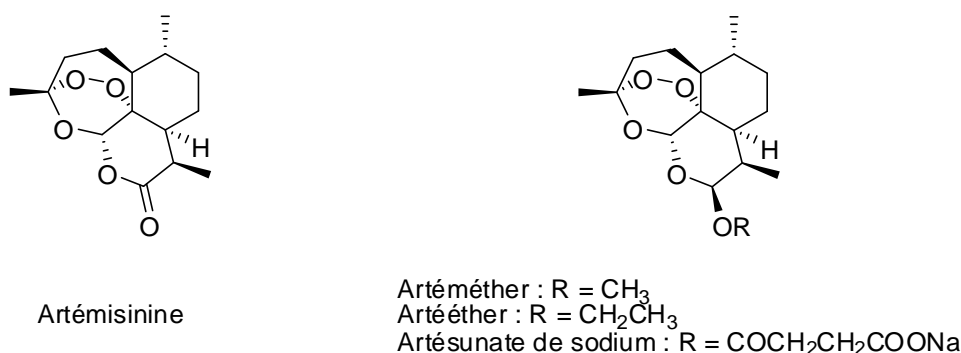
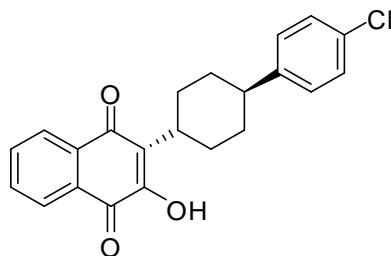


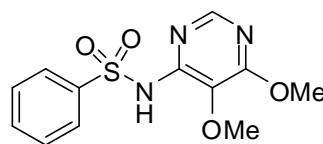
Figure 18: Structures de l'artémisinine et dérivés

Si les effets gamétocytocides des dérivés de l'artémisinine permettent de réduire la transmission de la maladie et de limiter les risques de développement de résistances, il en existe cependant malheureusement déjà des exemples (Jambou *et al.*, 2005). Les thérapies s'orientent donc vers des combinaisons entre l'artémisinine et ses dérivés et d'autres médicaments antipaludiques (ACT ou artemisinin combination therapy) (Butler *et al.*, 2010; Dondorp *et al.*, 2010). Certaines de ces combinaisons sont à doses fixes, comme l'atémether-luméfantrine (Coartem®, Riamet®) ou l'artésunate-amodiaquine (Coarsucam®) (Dondorp *et al.*, 2010; Yiqing, 2009). Les associations peuvent également impliquer d'autres molécules : la Malarone® est un mélange atovaquone-proguanil (*Figure 19*), fréquemment utilisé en prophylaxie dans les zones de chloroquino-résistance¹⁰. Ces combinaisons permettent ainsi de lutter contre le développement de la résistance du parasite aux différentes monothérapies existantes (Dondorp *et al.*, 2010), grâce à l'association de deux mécanismes d'actions différents sur le même stade de développement du parasite (Baird, 2005).

¹⁰ <http://www.phac-aspc.gc.ca>, Agence de la Santé Publique du Canada, consulté le 02/04/2011



Atovaquone



Proguanil

Figure 19 : Structures de l'atovaquone et du proguanil, molécules utilisées en combinaison dans la Malarone ®

L'atovaquone, bien qu'issue de la synthèse totale, possède cependant un pharmacophore inspiré par les substances naturelles (Newman et Cragg, 2007). Cet exemple, et le rôle toujours crucial dans la lutte contre la maladie des dérivés de la quinine et de l'artémisinine, molécules découvertes grâce aux pharmacopées traditionnelles, montrent bien l'importance de la chimie des substances naturelles et des études ethnopharmacologiques dans ce domaine (Bero *et al.*, 2009; Ginsburg et Deharo, 2011; Kaur *et al.*, 2009; Wright, 2005).

3. Etat du paludisme en Guyane française, où l'animal le plus dangereux de la forêt amazonienne n'est pas toujours celui que l'on croit...

Environ deux tiers des cas de paludisme recensés en Amérique du Sud le sont dans le bassin amazonien (Garcia, 2010). Au début des années 1950, le paludisme était fortement implanté dans toutes les zones habitées de la Guyane française, sans que les données disponibles permettent de connaître avec précision le niveau d'endémie (Carme *et al.*, 2009). Deux périodes de lutte intensive (traitement des habitations et large distribution de médicaments) ont permis de faire diminuer le nombre de cas dans les années 1950-1960 puis dans les années 1970 à 1980 (Carme *et al.*, 2009; Mouchet *et al.*, 1989). Le nombre de cas répertoriés a cependant subi une nouvelle augmentation dès le début des années 1980, due en particulier à l'arrivée massive de réfugiés fuyant la guerre civile au Surinam, puis à l'accroissement de l'orpaillage. Depuis le début des années 2000, la situation épidémiologique est plutôt stable, avec une moyenne de 3 920 accès palustres enregistrés, soit un taux d'incidence de 20 ‰ (Carme *et al.*, 2009) (Figure 21).

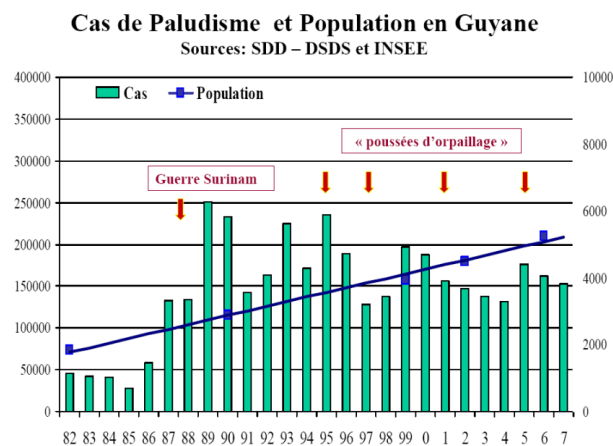


Figure 20 : Evolution du nombre de cas de paludisme et de la population en Guyane française de 1982 à 2007 - Source : SDD - DSDS et INSEE

Le profil épidémiologique n'est pas homogène sur l'ensemble du département (Figure 22). Les foyers majoritaires d'endémies sont situés le long des fleuves, en particulier les deux fleuves frontaliers : le Maroni à l'ouest, avec 77 % des cas recensés entre 1999 et 2003 (Fouque *et al.*, 2010), principalement sur sa partie haute entre Maripasoula et Antécume-Pata, et l'Oyapock à l'est. La situation a évolué ces dernières années, avec une augmentation du nombre des cas sur l'Oyapock et dans la région située entre Saint-Georges et Cayenne – les environs de Saint-Georges et le Bas-Oyapock sont classés depuis 2007 comme zone à risque élevé de paludisme – alors qu'une diminution sensible de la prévalence du paludisme a été observée le long de la frontière avec le Surinam, en particulier sur le Bas- et Moyen-Maroni, qui sont maintenant considérées comme des zones à faible risque de paludisme. Pour Grand-Santi par exemple, le taux d'incidence est passé de 130 ‰ en 2004 à 26 ‰ en 2007 (Carme *et al.*, 2009). La répartition entre *P. falciparum* et *P. vivax* est globalement équitable, avec seulement quelques cas relevés de *P. malariae* (2,6 %). De fortes variations existent cependant pour cette répartition suivant les zones d'endémie considérées. *P. falciparum* domine en effet dans la région du Bas-Maroni, traditionnellement peuplée par les Bushinengue d'origine africaine, peu métissés et bénéficiant donc d'une résistance naturelle à *P. vivax* (Hanf *et al.*, 2009). Dans cette région sont également relevés la majorité des cas de *P. malariae* (5 à 10 % des cas). *P. vivax* est au contraire plus fréquent sur le Haut-Maroni, où la population est majoritairement amérindienne, même si *P. falciparum* reste fortement présent dans cette zone. Il s'agit essentiellement de paludisme provenant des sites d'orpaillage. Sur le Haut-Oyapock, où se situent des villages peuplés de façon quasi-exclusive par des Amérindiens, *P. vivax* et *P. falciparum* sont équitablement représentés, la première devenant majoritaire sur la partie basse du fleuve. Sur le reste du territoire, les zones de forte endémie sont liées en particulier à la présence de sites d'orpaillage, comme à Saint-Elie ou Saül, où une véritable épidémie de paludisme, principalement à *P. falciparum*, se développe depuis 2008. De la même façon, la région de Régina fait

maintenant partie des zones à fort risque, la situation s'étant dégradée depuis la mise en service de la RN2 reliant l'est du département (Carne *et al.*, 2009). La relation entre orpaillage, immigration, développement des infrastructures routières et accroissement du paludisme a été discutée dans une étude récente (Carne, 2005).

Le vecteur principal du paludisme en Guyane est *Anopheles darlingi*, moustique se développant dans une très grande variété de gîtes – marais, petits étangs, canaux, fossés, végétation de bord de fleuves – sur l'ensemble du territoire (Mouchet *et al.*, 1989) Il s'agit de l'un des vecteurs du paludisme les plus importants en Amérique du Sud, et le plus important en zone amazonienne (Fouque *et al.*, 2010). D'autres espèces sont également présentes en Guyane, comme *A. aquasalis* dans les eaux saumâtres près des zones maritimes, *A. braziliensis*, *A. nuneztovari* et *A. intermedius* (Mouchet *et al.*, 1989). Ces deux dernières espèces ont été reconnues comme participant également à la transmission du parasite (Carne *et al.*, 2009). D'autres espèces, connues comme vecteurs dans les pays voisins, ont également été testées comme positives à la présence de sporozoïtes du *Plasmodium* en Guyane (Dusfour *et al.*, 2010).



Figure 21 : Le risque de paludisme en Guyane - carte mise à jour le 18 mars 2011 après validation par le Comité de suivi des maladies transmissibles par les insectes en Guyane – Source : « le Point Epidémiologique CIRE Antilles-Guyane » – surveillance du paludisme N°03/20

Il est enfin à noter que la Guyane est une région de forte chimiorésistance pour *P. falciparum*. La résistance à la chloroquine a été observée dès les années 1970, et constatée *in vitro* au milieu des années 1980. Elle est complète depuis les années 1990, mais une amélioration des CI_{50} commence à devenir visible depuis son exclusion des traitement en première intention en 1995 (Esterre *et al.*, 2009). Depuis 2008 sont appliquées de façon plus large les recommandations de la Réunion de Consensus sur le Paludisme en Guyane de 2002, soit l'utilisation de l'association artémether-luméfantrine (Riamet®) pour les cas de *P. falciparum*, et le recours à la primaquine en cas de *P. vivax*, ou la proposition de la Malarone® (association atovaquone-proguanil) en prophylaxie (Carme *et al.*, 2009; Esterre *et al.*, 2009). Les souches guyanaises sont actuellement toujours sensibles à la quinine, l'amodiaquine et l'artémether, mais la méfloquine et l'halofantrine sont maintenant classées en zone intermédiaire. La résistance à la doxycycline est observée depuis 2002, et le premier cas sud-américain de résistance à l'atovaquone a été décrit en 2005 sur un résident guyanais remontant le Maroni (Esterre *et al.*, 2009).

4. Substances naturelles antiplasmodiales amazoniennes et médecine populaire

Des extraits et métabolites secondaires purifiés issus de la flore d'Amazonie brésilienne ont présenté des activités antipaludiques intéressantes. En particulier, le néosergéolide issu de *Picrolemma sprucei* Hook. F. (Simaroubaceae) ou l'aspidocarpine, un alcaloïde isolé à partir d'*Aspidosperma desmanthum* Benth. ex Müll. Arg. (Apocynaceae) font partie des molécules les plus actives contre *P. falciparum* provenant de sources naturelles (Calderon *et al.*, 2009). Si les molécules isolées ne présentent pas directement d'activité antiplasmodiale, des applications différentes peuvent être trouvées. Dans le contexte de la prévalence de souche chloroquino-résistantes à Madagascar, des investigations ont par exemple été effectuées sur la base de remèdes traditionnels. Des études ont en particulier été menées sur les préparations à base de *Strychnos myrtoïdes* Gilg & Busse (Loganiaceae), utilisées dans la pharmacopée locale comme adjuvant des traitements à base de chloroquine. Deux molécules, la strychnobrasiline et la malagashine (*Figure 20*) en ont été isolées, mais ne présentent pas d'activité antiplasmodiale (CI_{50} de 73 et 69 µg/ml respectivement) ni de toxicité. Elles potentialisent cependant de façon significative la chloroquine. A ce jour, des évaluations cliniques menées sur les infusions d'écorce de *S. myrtoïdes* ont montré des résultats encourageants, potentialisant la chloroquine aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* (Gurib-Fakim, 2006).

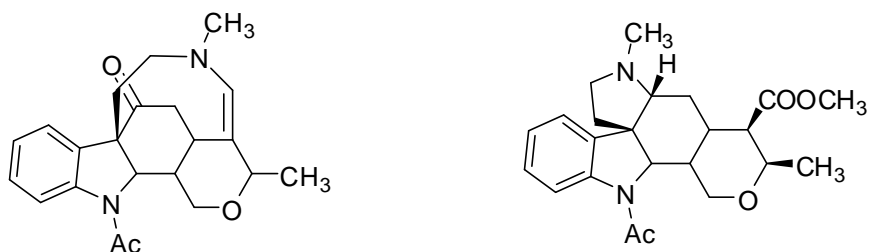


Figure 22 : Structures de la strychnobrasiline (à gauche) et de la malagashine (à droite) isolées de l'écorce de *Strychnos myrtilloides*

Concernant la perception de la maladie par les populations et les traitements utilisés en Guyane française, une étude a été menée par Vigneron *et al.* sur 117 personnes issues de divers groupes ethniques de Guyane française (Kali'na, Palikur, Créoles, Hmong, Brésiliens, Européens) par le biais de questionnaires comportements – attitudes – pratiques (Vigneron *et al.*, 2005). Ce travail a mis en évidence une bonne connaissance de la maladie (symptômes, transmission, gravité) par les personnes interrogées. Sur ce panel, 72 personnes soit 61 % ont déclaré avoir subi une crise palustre au moins une fois dans leur vie, et la grande majorité d'entre elles se sont alors rendue au centre de santé le plus proche. Sur ces 72 personnes, 27 (37,5 %) ont eu recours seulement à des traitements modernes, 3 à des remèdes traditionnels uniquement, et 42 (58,3 %) à une combinaison entre médicaments occidentaux et plantes médicinales. Ce recours n'est pas lié aux facteurs sociologiques (lieu de résidence, âge, sexe, groupe ethnique...) mais au fait d'avoir eu ou non une première crise de paludisme, orientant dans ce cas les patients vers l'usage des préparations phytothérapeutiques. Selon ces personnes : « les médicaments soignent, mais les plantes guérissent ». D'autres plantes sont également utilisées de façon préventive, comme les espèces participant à la fabrication des *amers* chez les Créoles ou les *tiviyine* chez les Palikur et Kali'na.

Ainsi, l'étude des préparations phytothérapeutiques employées par les différentes populations guyanaises est loin d'être une étude anecdotique et tournée vers le passé, mais bien une recherche correspondant au mode de vie actuel de ces populations et s'inscrivant pleinement un contexte en évolution constante. Les pharmacopées traditionnelles en Guyane occupent en effet toujours une place importante au sein des différentes communautés, et de nombreux ouvrages s'y intéressent, en particulier chez les Palikur, les Créoles et les Wayãmpi (Grenand *et al.*, 2004) ou chez les Wayana (Fleury, 2007). Cependant, peu de données quantitatives liées à l'utilisation des plantes médicinales ont été publiées. La première partie de ce chapitre, portant sur *Quassia amara* L., représente le volet chimique – isolement du principe actif, étude phytochimique de la tisane de *Q. amara*, influence de l'état du matériel végétal – d'une étude menée sur les préparations issues de cette plante utilisée en pharmacopée traditionnelle (Bertani, 2006; Bertani *et al.*, 2006). La seconde s'intéresse à une décoction de *P. acutangulum* DC. utilisée contre le paludisme par les Amérindiens Wayana du Haut-Maroni.

B. La tisane de *Quassia amara* L. : une « recette de grand-mère » contre le paludisme

1. *Quassia amara* L. (Simaroubaceae), le « quinquina de Cayenne » : historique, usages traditionnels et activités

Quassia amara L. (Figure 23) est un arbuste ou petit arbre de la famille des Simaroubaceae pouvant atteindre 2 à 8 m de haut, caractérisé par le fait que toutes les parties de la plante possèdent un goût amer. Les feuilles sont alternes, composées et imparipennées, les inflorescences sont d'une couleur rouge vif, les fruits sont des drupes de 1 à 2 cm de long. Cette espèce présente dans les forêts tropicales sud-américaines se retrouve également au Panama ou au Mexique¹¹. Elle est encore actuellement cultivée en Guyane française, où elle est connue sous le nom créole de *quiquina de Cayenne* ou *couachi* (ou *bwa-couachi*) (Grenand *et al.*, 2004).

Quassia amara est une espèce connue depuis longtemps pour son amertume intense (Dorvault, 1880). Elle a été utilisée à des fins médicinales depuis le milieu du XVIII^e siècle, après la découverte de ses propriétés fébrifuges vers 1730 par un esclave surinamais nommé Kwasi, un guérisseur renommé (« the celebrated Granman Quacy »), la plante ayant été nommée ainsi en son honneur par Linné (Price, 1979). Son usage est toujours présent au Surinam, en particulier sous la forme de gobelets taillés dans le bois appelés *Kwasi bita beker* (Odonne *et al.*, 2007).



Figure 23 : Feuilles et fruit de *Quassia amara* L. (à gauche) et fleur (à droite, photographie G. Bouchon)

¹¹ <http://www.tropicos.org>, consulté le 05/0/2011

La famille des Simaroubaceae, constituée de 32 genres et environ 200 espèces (Almeida *et al.*, 2007), regroupe de nombreuses espèces connues pour leurs propriétés antipaludiques, à l'instar de *Simaba guianensis* (Cabral *et al.*, 1993), *Simaba cedron* (Moretti *et al.*, 1994) ou *Picrolemma pseudocoffea* (Bertani *et al.*, 2005).

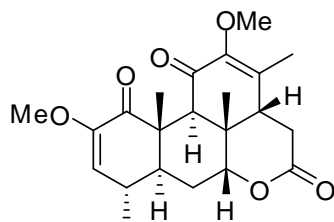
Les espèces du genre *Quassia* (*Q. amara*, *Q. undulata*, *Q. africana*, *Q. indica* par exemple) sont en particulier réputées en médecine traditionnelle dans le traitement des fièvres, du paludisme et des diarrhées, ainsi que pour leurs propriétés vermifuges, antimicrobiennes et cytotoxiques (Ajaiyeoba *et al.*, 1999; Apers *et al.*, 2002; Kitagawa *et al.*, 1996; Mbatchi *et al.*, 2006). Dans le cas de l'activité antiplasmodiale de *Q. amara*, étudiée par Ajaiyeoba *et al.*, des extraits de feuilles (extrait hexanique et extrait méthanolique) ainsi qu'un extrait méthanolique de bois ont été testés *in vivo* sur *Plasmodium berghei berghei*, les deux premiers extraits présentant une activité par voie orale à des doses de 100 mg/kg et de 200 mg/kg respectivement. Les études suivantes concernant l'activité antiplasmodiale de cette plante ont été menées en Guyane française par Bertani *et al.* sur des préparations phytothérapeutiques à base de bois et de feuilles de *Q. amara*, et seront présentées dans les paragraphes suivants (Bertani *et al.*, 2005). Parmi les autres activités biologiques mises en évidence, des extraits méthanoliques et hexaniques de feuilles et de bois ont inhibé *in vitro* la croissance de plusieurs micro-organismes (*E. coli*, *S. faecalis*, *S. aureus*, *A. niger*), l'extrait méthanolique de feuille étant le plus efficace (Ajaiyeoba et Krebs, 2003). Une activité antiulcéreuse, correspondant à une utilisation traditionnelle relevée par exemple en médecine populaire caribéenne, a également été mise en évidence à une dose de 100 mg/kg pour des extraits d'écorce sur des souris, aussi bien de façon curative que préventive (Toma *et al.*, 2002), pour un extrait aqueux de bois (Badilla *et al.*, 1998), ainsi que pour des extraits standardisés d'écorce de *Quassia amara*, Lipro® et Ligas® (Garcia-Barrantes et Badilla, 2011). Un extrait aqueux d'écorce a également montré *in vitro* une activité antirétrovirale *via* un effet protecteur des cellules lymphoblastoïdes-T MT2 vis-à-vis du virus de l'immunodéficience humaine (Abdel-Malek *et al.*, 1996). Des effets positifs sur certains oedèmes ont également été mis en évidence *in vivo*, les auteurs associant cette activité aux propriétés sédatives musculaires et relaxantes ou psychomimétiques des extraits d'écorces ainsi testés (Toma *et al.*, 2003). Plus récemment un extrait méthanolique de *Q. amara* (plante entière) a montré un potentiel anti-inflammatoire (Verma *et al.*, 2010). Enfin, une baisse de la fertilité chez les rats a été observée suite à l'injection d'un extrait au dichlorométhane de l'écorce de *Q. amara* (Parveen *et al.*, 2003). De même, une activité anti-fertilité réversible a été démontrée après traitement par voie orale de rats avec un extrait méthanolique de bois (Raji et Bolarinwa, 1997). La quassine a été identifiée comme le composé responsable de cette activité (Njar *et al.*, 1995). En ce qui concerne la cytotoxicité, une activité a été démontrée dans le cas de la sève de *Q. amara* *in vivo* sur des cellules P-388 de la leucémie chez la souris, et *in vitro* sur des cellules KB de carcinome humain. Un extrait aqueux de bois administré par voie orale à des rongeurs n'a quant à lui montré aucun signe de toxicité à des

doses allant de 250 à 1000 mg/kg. Par voie intrapéritonéale cependant des signes de toxicité aigüe ont été observés à 500 mg/kg, et une dose de 1000 mg/kg s'est avérée létale en 24 heures (Garcia Gonzalez *et al.*, 1997).

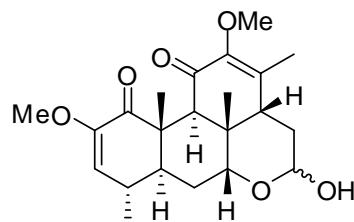
Q. amara est utilisée en Guyane française pour ses vertus fébrifuges, toniques et vermifuges. Les feuilles frottées sur le corps ou les décoctions d'écorce ou de feuilles sont également utilisées afin de repousser les moustiques et divers parasites (Grenand *et al.*, 2004). Cette utilisation peut être associée à la présence de quassine, une molécule aux propriétés insecticides puissantes, pour laquelle *Quassia amara* est par exemple cultivé en Amérique du Sud (Bertani, 2006; Sarais *et al.*, 2010). Dans le cadre d'applications technologiques ou phytosanitaires, des activités anti-appétantes vis-à-vis des insectes xylophages (*Hypsipyla grandella*) ont été mises en évidence pour des extraits méthanoliques de bois et de feuilles (Mancebo *et al.*, 2000). La pulvérisation d'un extrait aqueux de bois de *Q. amara* riche en quassine et néoquassine sur les cultures a également permis de protéger des vergers de l'attaque d'un hyménoptère, *Hoplocampa testudinae* (Psota *et al.*, 2010).

2. Les quassinoïdes : origine, activités biologiques et relations structure-activité

Les espèces de la famille des Simaroubaceae contiennent des principes amers connus sous le nom de quassinoïdes. Il s'agit de triterpènes oxygénés dont la plupart sont classés en cinq groupes suivant le nombre d'atomes de carbone de leur squelette (C-18, C-19, C-22 et C-25). A ce jour plus de 150 de ces composés ont été isolés et caractérisés (Fiaschetti *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2005). L'existence de principes amers dans *Quassia amara* avait été décrite dès 1835 (Almeida *et al.*, 2007), mais il fallut attendre plus d'un siècle pour que la quassine et la néoquassine (*Figure 24*), les deux premiers quassinoïdes isolés, soient obtenus à partir de bois de *Q. amara* (Clark, 1937). Leur structure fut partiellement déterminée par Hanson *et al.* sur la base d'observations physiques et chimiques lors de l'étude d'un groupe de quassinoïdes (Hanson *et al.*, 1954). La structure complète de ces molécules ne fut cependant totalement déterminée qu'en 1961 lorsque des techniques telles que la RMN purent leur être appliquées (Valenta *et al.*, 1961). La synthèse de la quassine, premier quassinoïde entièrement synthétisée, a été effectuée en 1980 par Grieco *et al.* (Grieco *et al.*, 1980). L'intérêt pour les quassinoïdes, en particulier ceux de type C-20, s'est accru dans les années 1970 avec la mise en évidence de l'activité antileucémique marquée de certaines de ces molécules (Guo *et al.*, 2005).



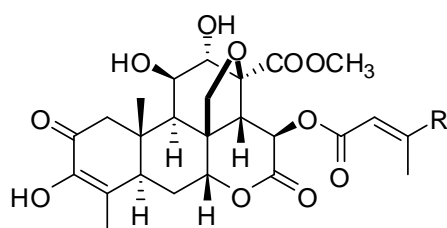
Quassine



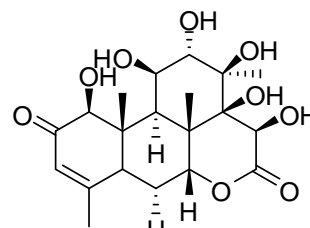
Néoquassine

Figure 24 : Structure de la quassine et de la néoquassine, premiers quassinoides isolés de *Q. amara*

La brucéantine (Figure 25) fut en particulier isolée en 1973 par Kupchan à partir de *Brucea antidysentrica* Mill. (Simaroubaceae) et identifiée comme le principe actif de cet arbre utilisé contre le cancer en Ethiopie (Kupchan *et al.*, 1973). Les essais cliniques n'ayant pas mis en évidence de régression des tumeurs, les études sur cette molécule furent interrompues à cette époque (Bedikian *et al.*, 1979). Les auteurs avaient également montré qu'à faible dose, les patients souffraient d'hypotension, de nausées et de vomissements, effets secondaires fréquemment observés pour ce type de traitement, et qu'à plus forte dose (150 µg/kg/jour) une toxicité sanguine était observée, conduisant à une réduction importante du nombre de plaquettes. Des études récentes ont cependant montré des résultats plus encourageants, donnant à penser que l'activité de la brucéantine sur certains types de cancers (leucémie, lymphome, myélome) mériterait de nouvelles investigations (Cuendet et Pezzuto, 2004). D'autres quassinoides comme le brusatol (Figure 26), isolé de *Brucea javanica*, ont été largement étudiés pour leur activité antitumorale et leurs effets préventifs sur le cancer (Fiaschetti *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2005; Hitotsuyanagi *et al.*, 2006; Itokawa *et al.*, 2008). Une nouvelle molécule de cette famille, le yadanzolide S (Figure 26), a également été testée. Il s'agit cette fois d'un composé tétracyclique plutôt que pentacyclique (Itokawa *et al.*, 2008).



Brucéantine : R = CH(CH₃)₂
 Brusatol : R = CH₃



Yadanzolide S

Figure 25 : Structures de la brucéantine, du brusatol et du yadanzolide S

Parmi les nombreuses activités pharmacologiques décrites pour ces molécules (Almeida *et al.*, 2007; Guo *et al.*, 2005; Vitanyi *et al.*, 1997; Wright *et al.*, 1988) figurent également les propriétés

antipaludiques. En 1947, près de 600 extraits de plantes provenant de 126 familles différentes avaient été testés sur des formes aviaires du paludisme *in vivo*. Trente genres démontrèrent une activité, les deux familles conduisant aux meilleurs résultats étant les Amaryllidaceae et les Simaroubaceae (Phillipson *et al.*, 1993). Depuis cette date, de nombreux quassinoïdes ont été évalués pour leur activité antiplasmodiale, environ 50 d'entre eux, issus de 13 espèces de Simaroubaceae appartenant à 9 genres (*Ailanthus altissima*, *A. excelsa*, *Brucea javanica*, *Castela texana*, *Eurycoma longifolia*, *Hannoa chlorantha*, *Quassia indica*, *Q. amara*, *Simaba cedron*, *S. guianensis*, *S. orinocensis*, *Simarouba amara*, *Soulamea tomentosa*) possédant un effet marqué (Muhammad et Samoylenko, 2007). Plusieurs de ces molécules possèdent des CI_{50} de l'ordre du nM vis-à-vis de *P. falciparum*, ce qui en fait des molécules plus actives que la chloroquine. Parmi celles-ci se trouvent par exemple la glaucarubinone avec une CI_{50} de 8 nM (Figure 27), la simalikalactone D (Figure 26) avec une CI_{50} de 1,8 nM ou la brucéantine avec une CI_{50} de 1,5 nM sur la souche K1 de *P. falciparum* (Bray *et al.*, 1987; O'Neill *et al.*, 1986).

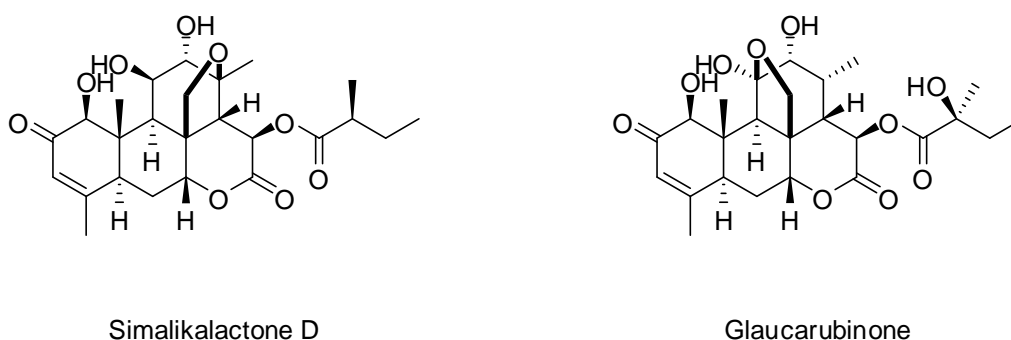


Figure 26 : Structure de deux quassinoïdes présentant une activité antiplasmodiale

Les quassinoïdes antipaludiques possèdent un squelette carboné tétracyclique avec un cycle lactone (Guo *et al.*, 2005; Phillipson *et al.*, 1993). Des études de relations structures activités menées ou citées par plusieurs auteurs, principalement dans le cas de la recherche de molécules anticancéreuses, ont permis de mettre en évidence plusieurs autres éléments structuraux (Figure 27) jouant un rôle particulièrement important dans les activités, dont l'activité antiplasmodiale, de ces molécules.

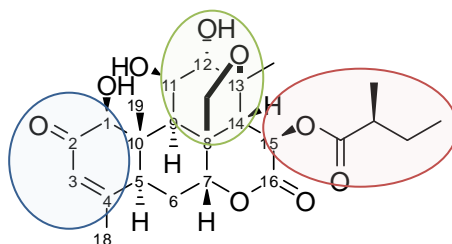


Figure 27 : Relations structure / activité des quassinoïdes à activité antiplasmodiale (exemple de la brucéantine)

La présence et la nature de la chaîne incluant une fonction ester en position 15 influent sur les activités anticancéreuse (Murakami *et al.*, 2004), antivirale (Apers *et al.*, 2002), antiamebique (Wright *et al.*, 1988) et antiplasmodiale (O'Neill *et al.*, 1986) des quassinoïdes. Celle-ci pourrait en effet permettre d'accroître le caractère lipophile de la molécule, permettant ainsi une meilleure biodisponibilité, et sa nature influant sur ses capacités de liaison avec le site d'action (Lang'at *et al.*, 1998). Une comparaison des activités de la glaucarubinone et de la 6 α -sénécioyloxychaparrinone montre de plus que la présence d'une chaîne possédant une fonction ester en C-15 améliore l'activité antiplasmodiale observée par rapport à une position latérale en C-6 (O'Neill *et al.*, 1986). La présence de deux fonctions ester, à la fois en C-6 et en C-15 comme dans le cas de l'undulatone conduit par contre à une diminution de l'activité par comparaison avec la molécule possédant une fonction ester seulement en C-15 (holacanthone) (Phillipson *et al.*, 1993).

Les motifs de substitution du cycle A (atomes de carbone de 1 à 5), en particulier la présence d'une cétone α,β -insaturée et la position du système conjugué, ont également été mis en évidence comme ayant un rôle crucial sur l'activité de ce type de molécules, ainsi que la présence de groupements hydroxyles libres répartis sur la structure (Fiaschetti *et al.*, 2011; Guo *et al.*, 2005; Hitotsuyanagi *et al.*, 2006).

Enfin, la présence d'un pont méthyl-oxygène dans le cycle C entre les atomes de carbone C-8 et C-13 ou C-8 et C-11 est une caractéristique structurale des quassinoïdes présentant les activités les plus élevées sur des souches chloroquino-résistantes ou chloroquino-sensibles de *P. falciparum* (Muhammad et Samoylenko, 2007), les quassinoïdes du premier groupe (isolés des genres *Brucea*, *Simaba* et *Quassia*) étant plus actifs que ceux du second (isolés des genres *Eurycoma*, *Simarouba*, *Castela*, *Hannoa* et *Ailanthus*), comme mis en évidence par O'Neill *et al.* (1986) dans le cas des CI_{50} mesurées pour la simalikalactone D et la brucéantine (pont C-8(13)) d'une part et la glaucarubinone (pont C-8(11)) d'autre part.

Ainsi les quassinoïdes font partie des molécules possédant une activité antipaludique parmi les plus intéressantes, mais rencontrent des difficultés à passer l'épreuve des essais cliniques du fait du lien fréquent entre activité et cytotoxicité. Les études de relation structure-activité restent donc essentielles, afin d'améliorer la sélectivité de ces composés par synthèse (Lang'at-Thoruwa *et al.*, 2003). Une autre voie possible est également celle consistant à évaluer les potentiels effets synergiques entre ces molécules et des médicaments antipaludiques, en mettant ainsi en valeur les fortes activités relevées à faibles doses aussi bien *in vitro* qu'*in vivo* pour ces molécules (Muhammad *et al.*, 2004).

Dans le cas de *Q. amara*, les quassinoïdes représentent de 0,05 à 0,25 % du bois, les molécules majoritaires étant la quassine, la néoquassine et la 18-hydroxyquassine (Vitanyi *et al.*, 1997). Ces molécules ont également été isolées d'un extrait brut commercial, ainsi que la paraïne, la

nigakilactone A et le quassialactol (Dou *et al.*, 1996). D'un extrait méthanolique du bois ont également été extraits la 11- α -*O*-(β -D-glucopyranosyl)-16- α -*O*-méthylnéoquassine, la 1- α -*O*-méthylquassine, la 12- α -hydroxy-13,18-déhydroparaïne, la 16- α -*O*-méthylnéoquassine, la 11-acétylparaïne (Barbetti *et al.*, 1993), la 11-dihydro-12-nornéoquassine, l'isoparaïne (Grandolini *et al.*, 1987). Un certain nombre d'autres molécules isolées des parties ligneuses de *Q. amara* sont citées dans la revue de Lopez Saez *et al.* (2008). Les molécules isolées des parties non ligneuses sont moins nombreuses : la quassine (Lopez Saez et Perez Soto, 2008) à partir des feuilles, fleurs et fruits, la simalikalactone D et la quassimarine à partir de la sève (Kupchan et Streelman, 1976).

Ainsi, si *Q. amara*, comme de nombreuses espèces de la famille des Simaroubaceae, est renommée en médecine populaire pour son effet antipaludique, l'activité antiplasmodiale des extraits n'a été que peu ou pas évaluée *in vitro* et *in vivo*. De plus, la composition chimique des feuilles, également utilisées de façon traditionnelle, reste très peu décrite. Une évaluation de l'activité antipaludique du remède préparé à partir des feuilles de *Quassia amara* prend donc tout son sens, avec comme objectifs à la fois de valider – ou non – la préparation traditionnelle et d'en mettre à jour la composition pour en éclairer le mécanisme d'action.

3. Etude de préparations phytothérapeutiques à base de feuilles de *Q. amara* L.

En Guyane française le paludisme reste un problème majeur. Alors que les médicaments sont aussi accessibles qu'en métropole, les pharmacopées traditionnelles occupent encore une place importante au sein des différentes communautés guyanaises. Une enquête épidémiologique de type comportements – attitudes – pratiques orientée sur les itinéraires thérapeutiques suivies en cas de crise palustre y a été menée en 2005 (Vigneron *et al.*, 2005). Il a ainsi été mis en évidence que le schéma thérapeutique observé dans ce cas de figure associe deux types de traitements, des médicaments conventionnels et des remèdes traditionnels à base de plantes. Le potentiel antipaludique de ces remèdes a ensuite été étudié sur différents modèles expérimentaux : *P. yoelii* *in vivo* et *P. falciparum* *in vitro* (Bertani *et al.*, 2005). Parmi les préparations capables d'inhiber le développement de *Plasmodium*, celle à base d'une décoction de feuilles de *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) s'est montrée particulièrement active aussi bien *in vitro* (CI₅₀ de 8,9 μ g/ml) qu'*in vivo* (62 % d'inhibition de la croissance du parasite à 90 mg/kg). Aucune toxicité n'a été relevée aux doses administrées. Des études complémentaires ont donc été menées sur ce remède possédant un fort potentiel antipaludique. Afin d'optimiser l'activité *in vitro* du remède, plusieurs préparations ont été réalisées et testées, la plus active d'entre elle étant une infusion de jeunes feuilles fraîches

(Figure 28). Le travail réalisé dans le cadre de cette thèse débute ici. Ce travail a été publié dans trois articles reproduits ci-après et décrivant :

- le fractionnement chimique bioguidé de ce remède, qui a permis d'en isoler un quassinolide connu pour son activité antiplasmodiale, la simalikalactone D (SkD), molécule qui inhibe 50% du développement parasitaire à 10 nM *in vitro* et à 3,75 mg/kg/jour *in vivo*, c'est-à-dire à des concentrations comparables à celle de l'artémether et inférieures à celle de la chloroquine, médicaments de référence (Bertani *et al.*, 2006).
- une étude menée sur l'impact de la maturation des feuilles et de leur état de fraîcheur sur l'inhibition de la croissance du parasite *in vitro* et *in vivo* afin de mieux comprendre les différences d'activité observées entre les différentes préparations. Ainsi, l'infusion de jeunes feuilles fraîches se révèle largement plus active que les autres préparations testées. *In vitro*, l'activité observée est bien corrélée à la concentration en simalikalactone D malgré quelques subtiles variations inexpliquées. *In vivo*, le meilleur résultat est obtenu pour l'infusion de jeunes feuilles sèches, ce qui pourrait sous-entendre que dans ce cas certains composés favorisent l'action ou la biodisponibilité du principe actif (Bertani *et al.*, 2007).
- un travail mené afin de savoir s'il pouvait être envisagé de recommander la tisane de jeunes feuilles fraîches comme traitement contre le paludisme auprès des populations, étant donné que malgré une absence de toxicité citée par les utilisateurs de préparations à base de *Q. amara*, les données de la littérature indiquent que la simalikalactone D est cytotoxique sur un certain nombre de lignées cellulaires. Les constituants de l'infusion de jeunes feuilles fraîches ont donc été isolés, identifiés, et leur activité antipaludique et cytotoxique évaluée. Il s'est avéré que parmi ces molécules – simalikalactone D, quassine, néoquassine et picrasines B, H, I (nouvelle) et J (nouvelle) (fiches produits et spectres RMN en Annexes 1-6) – seule la première joue un rôle dans les activités biologiques relevées. De plus, dans le contexte d'un traitement contre le paludisme, il apparaît que la dose nécessaire afin d'obtenir un effet curatif est proche de la dose toxique d'un analogue de la simalikalactone D, la brucéantine. Avant d'émettre une conclusion définitive, une étude clinique chez l'homme similaire à celle effectuée pour la brucéantine devrait être réalisée (Houël *et al.*, 2009).



Figure 28 : Jeune feuille de *Q. amara* L.
(photographie G. Bouchon)

Ethnopharmacological communication

Simalikalactone D is responsible for the antimalarial properties of an amazonian traditional remedy made with *Quassia amara* L. (Simaroubaceae)

S. Bertani^a, E. Houël^b, D. Stien^b, L. Chevolot^c, V. Jullian^d, G. Garavito^e,
G. Bourdy^f, E. Deharo^{f,*}

^a Laboratoire de Parasitologie Comparée et Modèles Expérimentaux, Muséum National d'Histoire Naturelle, 61, rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France

^b CNRS UMR Ecofog, BP709, 97379 Kourou cedex, Guyane, France

^c UPS-CNRS 2561, 16 Avenue André Aron, 97300 Cayenne, France

^d UMR 152 IRD, Université Paul Sabatier, Faculté de Pharmacie, 31062 Toulouse cx 9, France

^e Departamento de Farmacia, Facultad de Ciencias, Universidad Nacional de Colombia, Bogotá DC, Colombia

^f UMR 152 IRD, Université Paul Sabatier, Centre IRD, BP 165, 97323 Cayenne cx, Guyane, France

Received 7 March 2006; received in revised form 1 April 2006; accepted 13 April 2006

Available online 27 April 2006

Abstract

French Guiana (North-East Amazonia) records high malaria incidence rates. The traditional antimalarial remedy most widespread there is a simple tea made out from *Quassia amara* L. leaves (Simaroubaceae). This herbal tea displays an excellent antimalarial activity both in vitro and in vivo. A known quassinoid, simalikalactone D (SkD), was identified as the active compound, with an IC₅₀ value of 10 nM against FcB1 *Plasmodium falciparum* chloroquine resistant strain in vitro. Lastly, it inhibits 50% of *Plasmodium yoelii yoelii* rodent malaria parasite at 3.7 mg/kg/day in vivo by oral route. These findings confirm the traditional use of this herbal tea.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Antimalarial; *Quassia amara*; Quassinoids; Simalikalactone D; Traditional medicine

Quassia amara L. (Simaroubaceae) is a small tree growing only 2–6 m in height and is indigenous to South American rain forest. It is cultivated in gardens in French Guiana and popularly known as “Quinquina de Cayenne” as the result of its bitter taste and its traditional use against fever (Grenand et al., 2004). Usually, people put 10 entire fresh leaves (~20 g) into 1 l of cold water and boil for 10 min (Bertani et al., 2005). We collected *Quassia amara* leaves in Rémire-Montjoly (French Guiana), on June 2005, and we immediately prepared a decoction from the fresh plant material. Herbarium voucher (GB3012) was deposited in Cayenne Herbarium (CAY) and a specialist confirmed the botanical determination. In a previous study (Bertani et al., 2005), we demonstrated that a traditional preparation of *Quassia amara* presented antimalarial activities both

in vivo (62% inhibition at 90 mg/kg/day in mice) and in vitro (inhibitory concentration 50% (IC₅₀) of 8.9 µg/ml) against *Plasmodium yoelii yoelii* and *Plasmodium falciparum*, respectively. *Quassia amara* belongs to the Simaroubaceae family and contains quassinoids. The major one is quassin (Villalobos et al., 1999), which is inactive in vitro against *Plasmodium falciparum* (Lang'at-Thoruwa et al., 2003).

1. Materials and methods

1.1. Bioguided fractionation by semi-preparative high pressure liquid chromatography (HPLC) and NMR identification

Quassia amara fresh leaves (500 g) were infused in hot water (8 l) for 15 min. Leaves were removed and after cooling, the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. Antimalarial activity was retained in the organic phase, which was sub-

* Corresponding author. Tel.: +594 594 29 92 76; fax: +594 594 31 98 55.
E-mail address: deharo@cayenne.ird.fr (E. Deharo).

jected to a bioguided fractionation process. Simalikalactone D (SkD, HPLC: retention time = 11.4 min) was identified as the active ingredient (yield: 0.01% from fresh leaves). NMR spectra (Bruker DRX 400 spectrometer) were identical to those reported previously (Apers et al., 2002; Cabral et al., 1993; Moher et al., 1992; Ozeki et al., 1998; Tresca et al., 1971). Optical rotation was in agreement with previously reported value (found: $[\alpha]_D = +59^\circ$, CHCl_3 , $c = 0.11$; published: $[\alpha]_D = +53^\circ$, Tresca et al., 1971).

General remarks: Fractionation was performed by semi-preparative reverse-phase HPLC using a Discovery® C₁₈ column (25 cm × 21.2 mm, 5 μm , Supelco®). Separation was performed with a linear gradient of water/CH₃CN (70:30 changing over 10 min to 50:50), changing to pure CH₃CN at 12 min and remaining as is for 8 min. The flow rate was 15 ml/min. Eluates from the column were monitored at 245 nm.

2. Biological tests

Cultures of chloroquine-resistant Colombian FcB1 strain of *Plasmodium falciparum* were carried out according to Trager and Jensen (1976) and tests conducted following the technique extensively described in Bertani et al. (2005). In vivo assays were performed on a chloroquine-resistant rodent malaria strain parasite (*Plasmodium yoelii yoelii* 17 \times strain, clone 1.1) with the classical 4-day suppressive test (Peters, 1970). In both cases, chloroquine was used as control.

3. Results and discussion

French Guiana is located in the North-East of the South American continent, where humid tropical climate brings perfect conditions for persistent transmission of malaria all year long. Although the access to the care system is easy and almost free, people do still use herbal antimalarial remedies, either alone or in combination with modern drugs. In this context, *Quassia amara* is the Amazonian species with the highest antimalarial reputation for curative and preventive purposes (Vigneron et al., 2005). Ajaiyeoba et al. (1999) demonstrated earlier that hexane extract of *Quassia amara* leaves is active against *Plasmodium berghei* in vivo, but did not isolate the active compound. As molecules responsible for the antimalarial activity of aqueous infusion of *Quassia amara* seemed unknown, we decided to subject the traditional preparation to a bioguided fractionation process. HPLC separation gave 12 fractions. The in vitro antimalarial activity was essentially concentrated in one fraction (retention time: 11.4 min, maximum UV absorption: 245.2 nm). This fraction contained one compound in pure form, identified by NMR spectroscopy as a quassinoid: SkD; MW: 478.5 (Fig. 1). This molecule had been previously described by several authors (Apers et al., 2002; Cabral et al., 1993; Moher et al., 1992; Ozeki et al., 1998; Tresca et al., 1971) and had been described once in *Quassia amara* sap (Kupchan and Streelman, 1976) but never in fresh leaves. Several quassinoids are known to inhibit the growth of *Plasmodium falciparum* in culture at nMolar concentrations (Kuo et al., 2004; Muhammad et al., 2004) and to be orally active in vivo against rodent malaria parasite with doses ranging from

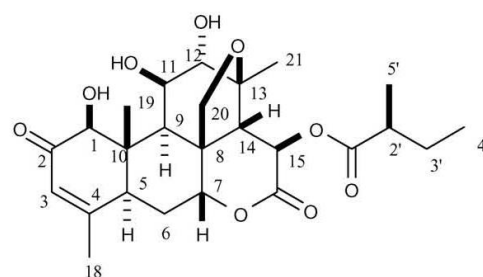


Fig. 1. Simalikalactone D.

0.7 to 18 mg/kg/day (Phillipson et al., 1993). In our hands, the IC₅₀ value for SkD was 10 nM, which is consistent with previously reported value (Cabral et al., 1993), while chloroquine was 12 times less active. In vivo, against *Plasmodium yoelii yoelii*, SkD administered orally had a median effective dose (ED₅₀) of 3.7 mg/kg/day, a dose very similar to that of chloroquine (ED₅₀: 2.6 mg/kg/day).

In conclusion, we have isolated and characterized simalikalactone D as the compound responsible for the in vitro (against *Plasmodium falciparum*) and in vivo (in rodent) antimalarial activities of an herbal tea prepared from *Quassia amara* fresh leaves.

Acknowledgements

S. Bertani was awarded a PhD fellowship from the Pierre & Marie Curie University, Paris 6, and the Ministère délégué à la Recherche, France. G. Garavito was awarded a PhD fellowship supported by the Programme Alβan, the European Union Programme of High Level Scholarships for Latin America, scholarship No. E04D039384CO. We thank the staff of the National Reference Centre on *Plasmodium* Chemoresistance (P. Esterre, E. Legrand and B. Volney, /Institut Pasteur de Guyane/, Cayenne, French Guiana) for hosting our team.

References

- Ajaiyeoba, E.O., Abalagu, U.I., Krebs, H.C., Oduola, A.M.J., 1999. In vivo antimalarial activities of *Quassia amara* and *Quassia undulata* plant extracts in mice. *Journal of Ethnopharmacology* 67, 321–325.
- Apers, S., Cimanga, K., Vanden Berghe, D., Van Meenen, E., Longanga, A.O., Foriers, A., Vlietinck, A., Pieters, L., 2002. Antiviral activity of Simalikalactone D, a quassinoid from *Quassia africana*. *Planta Medica* 68, 20–24.
- Bertani, S., Bourdy, G., Landau, I., Robinson, J.C., Esterre, P., Deharo, E., 2005. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 45–54.
- Cabral, J.A., McChesney, J.D., Milhous, W.K., 1993. A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. *Journal of Natural Products* 56, 1954–1961.
- Grenand, P., Moretti, C., Jacquemin, H., Prévost, M.F., 2004. In: Créoles, Wayâpi, Palikur (Eds.), *Pharmacopées traditionnelles en Guyane*. IRD Editions, Paris, p. 624.
- Kupchan, S.M., Streelman, D.R., 1976. Quassimarin, a new antileukemic quassinoid from *Quassia amara*. *Journal of Organic Chemistry* 41, 3481–3482.
- Kuo, P.C., Damu, A.G., Lee, K.H., Wu, T.S., 2004. Cytotoxic and antimalarial constituents from the roots of *Eurycoma longifolia*. *Bioorganic & Medicinal Chemistry* 12, 537–544.

- Lang'at-Thoruwa, C., Kirby, G.C., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C., Watt, R.A., Wright, C.W., 2003. Enhancement of the antiparasitic activity of quassin by transformation into a gamma-lactone. *Journal of Natural Products* 66, 1486–1489.
- Moher, E.D., Collins, J.L., Grieco, P.A., 1992. Synthetic studies on quassinoids: total synthesis of Simalikalactone D and assignment of the absolute configuration of the α -methylbutyrate ester side chain. *Journal of the American Chemical Society* 114, 2764–2765.
- Muhammad, I., Bedir, E., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Khan, I.A., Takamatsu, S., Pelletier, J., Walker, L.A., 2004. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. *Journal of Natural Products* 67, 772–777.
- Ozeki, A., Hitotsuyanagi, Y., Hashimoto, E., Itokawa, H., Takeya, K., de Mello Alves, S., 1998. Cytotoxic quassinoids from *Simaba cedron*. *Journal of Natural Products* 61, 776–780.
- Peters, W., 1970. *Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria*. Academic Press, New York, p. 64.
- Phillipson, J.D., Wright, C.W., Kirby, G.C., Warhurst, D.C., 1993. Tropical plants as sources of antiparasitic agents. In: Downum, K.R., Romeo, J.T., Stafford, H.A. (Eds.), *Phytochemical Potential of Tropical Plants*. Plenum press, New York, pp. 1–40.
- Trager, W., Jensen, J.B., 1976. Human malaria in continuous culture. *Science* 193, 673–675.
- Tresca, J.-P., Alais, L., Polonsky, J., 1971. Constituents amers du *Quassia africana* Baill. (Simaroubacées). Simalikalactones A, B, C, D et simalikalémiacétal A. *Comptes-rendus Hebdomadaires des Séances de l'Académie des Sciences. Série C* 273, 601–604.
- Vigneron, M., Deparis, X., Deharo, E., Bourdy, G., 2005. Knowledge Attitudes and Practices study applied to antimalarial remedies used in French Guiana. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 351–360.
- Villalobos, R., Marmillod, D., Ocampo, R., Mora, G., Rojas, C., 1999. Variations in the quassin and nequassin content in *Quassia amara* (simaroubaceae) in Costa Rica: ecological and management implications. *Acta Horticulturae* 502, 369–376.

Quassia amara L. (Simaroubaceae) leaf tea: Effect of the growing stage and desiccation status on the antimalarial activity of a traditional preparation

S. Bertani^a, E. Houël^b, G. Bourdy^c, D. Stien^b, V. Jullian^c, I. Landau^a, E. Deharo^{c,*}

^a Laboratoire de Parasitologie Comparée et Modèles Expérimentaux, Muséum National d'Histoire Naturelle, 61 rue Buffon, 75231 Paris Cedex 05, France

^b CNRS UMR Ecofog, BP709, 97379 Kourou Cedex, Guyane, France

^c UMR 152 IRD—Université Paul Sabatier, Centre IRD, BP 165, 97323 Cayenne cx, Guyane, France

Received 22 August 2006; received in revised form 20 October 2006; accepted 25 October 2006

Available online 6 November 2006

Abstract

In French Guiana, *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) leaf tea is a well-known widely used traditional antimalarial remedy. Impact of the vegetal sampling condition on *in vivo* and *in vitro* antimalarial activity was assessed. Traditional infusions were prepared with juvenile or mature leaves, both either fresh or dried. Results showed that growing stage and freshness of vegetal material exert a striking effect on antimalarial activity, both *in vitro* and *in vivo*. By far, leaf tea made from fresh juvenile (FJ) *Quassia amara* leaves was the most active. *In vitro*, active component (simalikalactone D) concentration correlates biological activities, although unexplained subtle variations were observed. *In vivo*, tea made with dried juvenile (DJ) leaves displays a peculiar behavior, meaning that some components may help simalikalactone D delivery or may be active *in vivo* only, therefore enhancing the expected curative effect of the traditional preparation.

© 2006 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

Keywords: Antimalarial; *Quassia amara*; Quassinoids; Simalikalactone D; Traditional medicine

1. Introduction

In French Guiana, malaria is present all year long (Carme, 2005). Although the care system is free, people do still use herbal antimalarial remedies either alone or in combination with modern drugs. Through a Knowledge Attitude Practice questionnaire (Vigneron et al., 2005), the context of use of traditional antimalarial remedy was approached, and most used and prized remedies were selected, prepared in field condition, and submitted to biological evaluation (Bertani et al., 2005). One of these remedies displayed outstanding *in vitro* and *in vivo* antimalarial activity. This traditional preparation, also highly recommended by people in the field both for its simplicity and reputation, is just a simple tea made from fresh leaves of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). In a previous study, we identified simalikalactone D (SkD, IC₅₀ = 10 nM) as the molecule responsible

for the antimalarial activity of the traditional remedy (Bertani et al., 2006). However, further experiments have allowed us to demonstrate that large differences between preparations can be observed. Originally, leaves were randomly picked up onto shrubs during field collects, and since huge differences were observed, we hypothesized that key parameters might be the age of the leaves and their desiccation state. We therefore undertook studies aiming to correlate preparation parameters with biological activity, in order to fix the best recipe for *Quassia amara* antimalarial infusion.

2. Material and methods

2.1. Sample collection

Quassia amara leaves were collected in June 2005 at Rémire-Montjoly, French Guiana. Approximately, 100 g of pale green to pink juvenile leaves from the apex, together with the same quantity of dark green mature leaves, were collected. Herbarium voucher (GB3012) was deposited in French Guiana

* Corresponding author. Tel.: +33 594 594 29 92 76;
fax: +33 594 594 31 98 55.

E-mail address: eric.deharo@ird.fr (E. Deharo).

Herbarium (CAY), where a specialist confirmed botanical identification.

2.2. Sample preparation

Half of each collected sample was spread and left on a drier tray (in a shaded and ventilated open room) for 72 h, the rest being used in preparations within the first hour of collection. Traditional remedies were prepared as follows: approximately six leaves (5–6 g when fresh) were rapidly cleaned with tap water and placed in a 500 ml flask. Boiling water (500 ml) was poured over and the tea was left to infuse for 15 min. We obtained four different leaf teas from fresh juvenile (FJ), dried juvenile (DJ), fresh mature (FM) and dried mature (DM) leaves, respectively. *Cinchona officinalis* Wedd. (Rubiaceae) bark (source of quinine and derivatives) was used as natural antimalarial control and prepared as follows: 50 g of grounded bark was mixed with 1 l of boiling water and left for 15 min before filtration as described in Bertani et al. (2005).

2.3. Assays on *Plasmodium*

Culture of *Plasmodium falciparum* (chloroquine resistant Colombian FcB1 strain) was carried out according to Trager and Jensen (1976) and tests were conducted in triplicate following the technique extensively described in Bertani et al. (2005) and Akoachere et al. (2005) for combination studies. *In vivo* assays were performed on a chloroquine resistant rodent malaria strain parasite (*Plasmodium yoelii yoelii* 17X strain, clone 1.1) with the classical 4-day suppressive test (Peters, 1970) on groups of six mice (two experiments were conducted). In both cases, the *Cinchona officinalis* preparation was used as control. The IC₅₀ calculation was made possible because preparations were submitted to a speedvacuum treatment and residues were weighted.

2.4. Bioguided fractionation

High pressure liquid chromatography (HPLC) separations were performed with a W600 pump and a W2996 photodiode array absorbance detector (Waters®) using a Discovery® C18 column (25 cm × 21.2 mm, 5 µm, Supelco®).

Quassia amara young fresh leaves (515 g) were infused in hot water (8 l) for 15 min. Leaves were removed and after cool-

ing, the aqueous layer was extracted with CH₂Cl₂. Antimalarial activity was retained in the organic phase, which was subjected to a bioguided fractionation process (semi-preparative HPLC and biological evaluation of fractions). Two fractions were active *in vitro*. The most active one contained simalikalactone D (SkD, 49 mg, 0.0095%), while picrasine B (61 mg, 0.012%) was isolated in the less active fraction. NMR spectra were identical to those reported in the literature (SkD: Cabral et al., 1993; Apers et al., 2002; Picrasin B: Handa et al., 1983; Kim et al., 1990).

2.5. SkD concentration in crude leaf teas

HPLC analyses were performed with the equipment described above, using a Discovery® C18 column (15 cm × 4.6 mm, 5 µm, Supelco®). RP-HPLC was used to measure the concentration of SkD (UV max = 245 nm) in infusions. Injections (300 µl) were performed using 70% water, 30% CH₃CN as elution solvent. The flow rate was 1.0 ml/min. Three-dimension HPLC profiles of *Quassia amara* extracts were obtained. Integration of SkD signal (*t_R* = 9.7 min) at 245 nm and comparison with calibration curve allowed to determine the concentration of SkD in leaf teas. Alike SkD concentration and although we did not measure it accurately, it can be seen clearly in HPLC profiles that picrasin B concentration substantially diminished in DJ and mature leaf teas.

3. Results and discussion

Reference *Cinchona officinalis* bark displayed an IC₅₀ against *Plasmodium falciparum* *in vitro* of 0.21 ± 0.03 µg/ml. The most active *Quassia amara* preparation was the one made with fresh juvenile leaves. Activities were: FJ > DJ > FM > DM. It is important to note that in a conventional screening procedure (Rasoanaivo et al., 2004), only FJ leaf tea would have been considered as displaying a good activity. DJ and FM leaf tea activity would have been considered as moderate to weak, and activity would have been denied to DM extract. Since we had previously isolated and identified SkD as the active component of *Quassia amara* leaf tea, we compared the concentrations of SkD in each preparation and their relative antimalarial properties. Results are reported in Table 1.

Table 1
Quassia amara leaf tea activities against *Plasmodium falciparum* *in vitro* and *Plasmodium yoelii yoelii* *in vivo*

Leaf status ^a	Concentration of SkD in leaf tea (µg/ml)	<i>In vitro</i> volume of leaf tea needed to reach IC ₅₀ ^b (µl)	<i>In vitro</i> concentration of SkD at IC ₅₀ ^c (nM)	<i>In vitro</i> % inhibition ^d
FJ	4.63	0.8	7.6	43 ± 4
DJ	0.05	12.5	1.4	71 ± 7
FM	0.05	100	10.7	25 ± 3
DM	2.10 ⁻³	n.d. ^e	n.d.	25 ± 2

^a FJ: fresh juveniles, DJ: dried juveniles, FM: fresh mature, DM: dried mature leaves.

^b Unit (µl/ml) represents the volume of leaf tea (µl) added to 1 ml of culture.

^c IC₅₀ (SkD) = 10 nM. A value close to this one indicates that the biological activity can be attributed to SkD only.

^d 0.5 ml of leaf tea were administered by oral route twice a day for 4 days.

^e n.d. = not determined. IC₅₀ was not reached, even at the highest concentration tested.

HPLC profiles of fresh juvenile leaves preparations were quite different from others. Concentration of SkD was measured using a calibration curve made from previously isolated SkD. Only FJ leaf tea contained a significant amount of SkD (4.63 µg/ml). DJ and FM leaf teas contain about a 100 times less SkD, and its presence was barely undetectable in dried mature leaf tea. *In vitro* biological assays match SkD concentration for FJ and FM leaf teas, while it seems slightly too low to account for the recorded biological activity of DJ leaf tea. We did obtain one other bioactive fraction upon bioguided fractionation of fresh young leaves traditional preparation. This fraction was found to contain known quassinoid picrasin B, which proved to be approximately 100 times less active than SkD. Since its concentration was rather weak in the tea (SkD: 49 µg/ml; picrasin B: 61 µg/ml), it turned out that picrasin B could not account for the exceptional biological activity of the traditional leaf tea. Furthermore, picrasin B and SkD do not display any synergetic action *in vitro* (data not shown).

In vivo, *Cinchona officinalis* bark inhibited 67% of the *Plasmodium yoelii yoelii* growth with 500 mg/kg/day. As regards, *Quassia amara* leaf teas made out from young leaves did display interesting antimalarial activity, while those prepared with mature leaves were inactive. Surprisingly, DJ leaf tea was more potent than FJ (71% versus 43% inhibition) although it contains much less SkD and was less active *in vitro*. Since picrasin B concentration is also very weak in DJ leaf tea, a possible explanation lies in the fact that DJ leaf tea surprisingly contains five times more non-volatile material after water evaporation. It can, therefore, be hypothesized that some constituents of this total extract may help SkD delivery and assimilation and/or may enhance SkD antimalarial activity as proposed elsewhere for artemisinin (Chang and But, 1986; Mueller et al., 2000). Or else, biological activity *in vivo* may also result from the biotransformation of compounds that are not active *in vitro*. Indeed, it is not uncommon to see inactive molecules transformed into active ones upon digestion or in the circulation, and such molecules cannot be isolated through bioguided fractionation.

4. Conclusion

We demonstrated that antimalarial activity of *Quassia amara* leaf teas first depends on the age of the leaves and then on the desiccation status of vegetal material. Gatherer should, therefore, be aware that only scarce young leaves will yield active tea. Interestingly, DJ leaf tea proved very potent *in vivo*, and its potency does not seem to arise from SkD alone. In our opinion, these results ask for a reexamination of DJ leaf tea constituents. Further studies will be reported in due course.

Acknowledgements

S. Bertani was awarded a PhD fellowship from the Pierre & Marie Curie University, Paris 6, and the Ministère délégué à la Recherche, France. We thank the staff of the National Reference Centre on *Plasmodium* Chemoresistance (P. Esterre, E. Legrand and B. Volney, Institut Pasteur de Guyane, Cayenne, French Guiana) for hosting our team. We also thank Marie-France Prevost for determination of *Quassia amara* at the herbarium of Cayenne.

References

- Akoachere, M., Buchholz, K., Fischer, E., Burhenne, J., Haefeli, W.E., Schirmer, R.H., Becker, K., 2005. *In vitro* assessment of methylene blue on chloroquine-sensitive and -resistant *Plasmodium falciparum* strains reveals synergistic action with artemisinins. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 49, 4592–4597.
- Apers, S., Cimanga, K., Vanden Berghe, D., Van Meenen, E., Longanga, A.O., Foriers, A., Vlietinck, A., Pieters, L., 2002. Antiviral activity of simalikalactone D, a quassinoid from *Quassia africana*. *Planta Medica* 68, 20–24.
- Bertani, S., Bourdy, G., Landau, I., Robinson, J.C., Esterre, P., Deharo, E., 2005. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 45–54.
- Bertani, S., Houël, E., Stien, D., Chevolut, L., Jullian, V., Landau, I., Bourdy, G., Deharo, E., 2006. Simalikalactone D is mainly responsible for the antimalarial properties of an Amazonian traditional remedy made with *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 108, 155–157.
- Cabral, J.A., McChesney, J.D., Milhous, W.K., 1993. A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. *Journal of Natural Products* 56, 1954–1961.
- Carme, B., 2005. Substantial increase of malaria in inland areas of eastern French Guiana. *Tropical Medicine and International Health* 10, 154–159.
- Chang, H.M., But, P.P.H., 1986. *Pharmacology and Applications of Chinese Materia Medica*, vol. 1. World Scientific Publishing, Singapore, pp. 605–609.
- Handa, S.S., Kinghorn, A.D., Cordell, G.A., Farnworth, N.R., 1983. Plant anticancer agents XXV. Constituents of *Soulamea soulameoides*. *Journal of Natural Products* 46, 359–364.
- Kim, M., Kawada, K., Gross, R.S., Watt, D.S., 1990. An enantioselective synthesis of (+)-picrasin B, (+)- Δ^2 -picrasin B, and (+)-quassin from the *R*(–) enantiomer of the Wieland–Miescher ketone. *Journal of Organic Chemistry* 55, 504–511.
- Mueller, M.S., Karhagomba, I.B., Hirt, H.M., Wernakor, E., Li, S.M., Heide, L., 2000. The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. *Journal of Ethnopharmacology* 73, 487–493.
- Peters, W., 1970. *Chemotherapy and Drug Resistance in Malaria*. Academic Press, New York, p. 64.
- Rasoanaivo, Ph., Deharo, E., Ratsimamanga-Urverg, S., Frappier, F., 2004. Guidelines for the evaluation of the non-clinical efficacy of traditional antimalarials. In: Wilcox, M., Bodeker, G., Rasoanaivo, Ph. (Eds.), *Traditional Medicinal Plants and Malaria*. CRC Press, pp. 255–270.
- Trager, W., Jensen, J.B., 1976. Human malaria in continuous culture. *Science* 193, 673–675.
- Vigneron, M., Deparis, X., Deharo, E., Bourdy, G., 2005. Knowledge Attitudes and Practices study applied to antimalarial remedies used in French Guiana. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 351–360.



Quassinoid constituents of *Quassia amara* L. leaf herbal tea. Impact on its antimalarial activity and cytotoxicity

Emeline Houël^a, Stéphane Bertani^b, Geneviève Bourdy^{c,d}, Eric Deharo^{c,d}, Valérie Jullian^{c,d}, Alexis Valentin^{c,d}, Séverine Chevalley^{c,d}, Didier Stien^{a,*}

^a CNRS, UMR Ecofog, Université des Antilles et de la Guyane, Cayenne, France

^b USM 0307, Laboratoire de Parasitologie Comparée et Modèles Expérimentaux, Muséum National d'Histoire Naturelle, Paris, France

^c Université de Toulouse, UPS, UMR 152 (Laboratoire de pharmacochimie des substances naturelles et pharmacophores redox), 118, rte de Narbonne, F-31062 Toulouse Cedex 9, France

^d UMR 152 Institut de Recherche pour le Développement - Université de Toulouse 3, Faculté des Sciences Pharmaceutiques, 31062 Toulouse, France

ARTICLE INFO

Article history:

Received 1 May 2009

Received in revised form 21 July 2009

Accepted 30 July 2009

Available online 7 August 2009

Keywords:

Quassia amara L.

Simaroubaceae

Leaf tea

Antimalarial activity

Cytotoxicity

Simalikalactone D

ABSTRACT

Aim of the study: Our objective was to assess whether it could be contemplated to recommend *Quassia amara* young leaf tea for treatment against malaria, and if yes, set up a standard protocol for preparing the herbal tea.

Materials and methods: The leaf tea was extracted with methylene chloride and the organic extract was fractionated with HPLC. Pure compounds were characterized and their *in vitro* cytotoxicity and antiplasmodial activity was determined.

Results and discussion: We discovered that antimalarial *Quassia amara* young leaf tea contains several quassinoids: simalikalactone D (SkD, 1), picrasin B (2), picrasin H (3), neoquassin (4), quassin (5), picrasin I (6) and picrasin J (7). These last two compounds are new. In addition, our experiments demonstrate that both biological activity and cytotoxicity of the remedy may be attributed solely to the presence of SkD.

Conclusion: In conclusion, this preparation should not be recommended for treatment of malaria until a clinical study in humans is performed with SkD.

© 2009 Elsevier Ireland Ltd. All rights reserved.

1. Introduction

Within the framework of a study aiming at identifying traditional antimalarial remedies, we have had the opportunity of working in French Guiana. In this French department, the incidence of malaria is very high (one of the highest in South-America) (Chaud et al., 2006). Further to a knowledge attitudes and practices study conducted in that country, we have identified certain remedies used commonly by the population for curing or diminishing the symptoms of malaria crises (Bertani et al., 2005; Vigneron et al., 2005). Among the remedies listed, one is used predominantly. It consists of a prolonged decoction of mature leaves of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae), administered orally. The antimalarial activity of this preparation was assessed *in vitro* and *in vivo* (Bertani et al., 2005; Bertani et al., 2006) and in order to optimize the *in vitro* antimalarial activity, later on, different types of preparation have been realized and tested. The most active *in vitro* preparation is an infusion of leaves collected at the apex, hence young leaves, and

prepared when fresh, i.e., without any prior desiccation. This preparation demonstrated a very good activity, *in vitro* as well as *in vivo* (Bertani et al., 2007). An active compound, simalikalactone D (SkD), could be identified within this preparation (Bertani et al., 2006). SkD is a quassinoid with exceptional *in vitro* activity against *Plasmodium falciparum* (IC₅₀ = 10 nM). However, it is also cytotoxic for a number of cellular lineages (see for example Ozeki et al., 1998; Xu et al., 2000). We then deemed significant to be able to characterize, quantify, assess the antiparasitic and cytotoxic activities of all the quassinoids present in the herbal tea prepared with young leaves of *Q. amara*, and to compare antimalarial activity and cytotoxicity (or presumed toxicity) of this preparation. In fine, our objective was to assess whether it could be contemplated to recommend this preparation for treatment against malaria, and if yes, set up a standard protocol for preparing the herbal tea in order to guarantee a constant amount of active principle administered.

2. Materials and methods

2.1. General remarks

Dichloromethane (laboratory grade) was purchased from Fisher Scientific, acetonitrile (Lichrosolv grade) was purchased from

* Corresponding author. CNRS, UMR Ecofog, Institut d'Enseignement Supérieur de la Guyane, BP 792, 97337 Cayenne Cedex, France (French Guiana). Tel.: +594 594 29 75 17; fax: +594 594 28 47 86.

E-mail address: didier.stien@guyane.cnrs.fr (D. Stien).

Merck. Water (HPLC grade) was obtained from a Milli-Q system (Milli-Q plus, Millipore Bedford, MA). Other reagents were purchased from Sigma–Aldrich unless otherwise stated.

Semi-preparative chromatography was performed with a W600 pump and a W2996 photodiode array absorbance detector (Waters®) using a Discovery® C18 column (25 cm × 21.2 mm, 5 µm, Supelco®).

Optical rotations were measured with a PerkinElmer 241 polarimeter.

¹H NMR spectra were recorded at 300–500 MHz and ¹³C NMR spectra at 75.4, 100.6 or 125.8 MHz, as stated. Chemical shifts (δ) are in ppm downfield from tetramethylsilane (TMS), and coupling constants (J) are in Hz (s stands for singlet, d for doublet, t for triplet, q for quartet, quint for quintet, m for multiplet, br for broad, a for axial and e for equatorial).

Radioactivity is counted using a Wallac® 1450 Betalux scintillation counter (1450-Microbeta Trilux, Wallac PerkinElmer).

2.2. Plant material

Q. amara (Simaroubaceae) leaves were collected at Rémire-Montjoly, French Guiana. *Q. amara* is not protected and can be collected without restriction at this location. Approximately 500 g of pale green to pink juvenile leaves from the apex were collected. Herbarium voucher (GB3012) was deposited in French Guiana Herbarium (CAY) where a specialist confirmed botanical identification.

2.3. Extraction

The plant material (515 g) was separated in two portions and placed in two 5 L Erlenmeyer flasks. Boiling water (2 × 4.5 L) was poured over and left for 30 min. Leaves were removed and after cooling the infusion was extracted with methylene chloride (300 mL followed by 200 mL for each batch). The combined organic

layers were dried on Na₂SO₄. Filtration and evaporation of the solvent yielded 658 mg of extract.

2.4. Tea components isolation

Crude extract was diluted in water/CH₃CN (50/50). Purifications were carried out on 1 mL of solution using a linear gradient of 70% water, 30% CH₃CN changing over 10 min to 50% water, 50% CH₃CN, and remaining at 100% CH₃CN from 12 to 20 min. The flow rate was 15 mL/min. Three-dimension HPLC profiles of *Q. amara* extracts were obtained and the eluates from the column were monitored at 214 and 245 nm. Fractions containing the same constituent were collected together and evaporation allowed for isolation of simalikalactone D (**1**, 48.4 mg, 5.4 mg L⁻¹) (Apers et al., 2002), picrasin B (**2**, 61.1 mg, 6.8 mg L⁻¹) (Kawada et al., 1989; Kim et al., 1990), picrasin H (2-O-methylpicrasin B, **3**, 30.5 mg, 3.4 mg L⁻¹) (Kawada et al., 1989), neoquassin (**4**, mixture of anomers 6:4, 39.5 mg, 4.4 mg L⁻¹) (Valenta et al., 1961), quassin (**5**, 30.6 mg, 3.4 mg L⁻¹) (Kim et al., 1990) as well as the new picrasins I (**6**) and J (**7**). All compounds were isolated in pure forms. The second value in mg L⁻¹ represents the concentration of the compounds in the tea based on the isolated yield.

Picrasin I (3R-3-hydroxy-2-O-methylpicrasin B, **6**, 16.4 mg, 1.8 mg L⁻¹): *R*_t = 6.5 min; λ_{max} = 252 nm; [α]_D¹⁸ = -25.00 (*c* = 0.2, MeOH:CH₂Cl₂ 90/10); ¹H (CD₃CN, 500 MHz) and ¹³C NMR (CD₃CN, 125.8 MHz) NMR data are reported in Table 1; HRMS calcd. for C₂₂H₃₁O₇⁺ (MH⁺) 407.2064, found 407.2060; HRMS calcd. for C₂₂H₃₄NO₇⁺ (MNH₄⁺) 424.2329, found 424.2327.

Picrasin J (3S-3-hydroxy-2-O-methylpicrasin B, **7**, 50.1 mg, 5.6 mg L⁻¹): *R*_t = 7.2 min; λ_{max} = 252 nm; [α]_D¹⁸ = -22.00 (*c* = 0.6, MeOH); ¹H (CDCl₃, 300 MHz) and ¹³C (CDCl₃, 75.4 MHz) NMR data are reported in Table 1; HRMS calcd. for C₂₂H₃₁O₇⁺ (MH⁺) 407.2064, found 407.2073; HRMS calcd. for C₂₂H₃₄NO₇⁺ (MNH₄⁺) 424.2329, found 424.2327.

Table 1
¹H and ¹³C NMR assignments and long range ¹H → ¹³C correlations for picrasins I and J (**6** and **7**)^a.

Position	¹ H (δ, mult., J (Hz))		¹³ C (δ)		¹ H → ¹³ C corr.	
	6	7	6	7	6	7
1			207.8	206.4		
2	4.38, d, 8.9	4.48, d, 3.8	86.8	81.3	C-3, C-18, MeOC2	C-1, C-3, C-18, MeOC2
3	2.95, br t, 9.8	4.20, dd, 3.6, 1.8	80.9	76.4	C-2, C-18	C-1, C-2, C-5, C-18
4	1.91, m	2.05, m	36.4	33.0	C-3, C-5, C-18	C-5, C-18
5	1.16, m	2.03, td, 11.5, 2.7	42.2	39.0	Overlapping signals	C-4, C-7
6	a: 1.88, m b: 1.96, m	ax: 1.81, m eq: 1.91, m	26.4	26.0	a: overlapping signals b: C-19	ax: C-5 eq: C-5
7	4.33, t, 2.8	4.26, br t, 2.5	82.5	82.1	C-5, C-9, C-20	C-5, C-14, C-20
8			37.2	36.8		
9	3.12, s	3.24, s	48.1	47.5	C-1, C-5, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12, C-14, C-19, C-20	C-1, C-5, C-7, C-8, C-10, C-11, C-12, C-14, C-19, C-20
10			49.6	48.5		
11			192.1	191.0		
12			148.8	148.2		
13			142.8	139.7		
14	2.57, dd, 11.9, 5.6	2.40, dd, 12.4, 6.4	47.3	47.2	C-7, C-8, C-9, C-12, C-13, C-15, C-20, C-21	C-7, C-8, C-9, C-12, C-13, C-15, C-20, C-21
15	ax: 2.51, dd, 17.2, 11.9 eq: 2.91, dd, 17.2, 5.6	ax: 2.62, dd, 18.3, 12.4 eq: 2.93, dd, 18.3, 6.4	31.9	31.5	ax: C-13, C-14, C-16 eq: C-8, C-14, C-16	ax: C-13, C-14, C-16 eq: C-8, C-14, C-16
16			169.9	168.8		
18	1.00, d, 6.4	1.06, d, 6.2	15.5	14.6	C-3, C-4, C-5	C-3, C-4, C-5
19	1.43, s	1.45, s	15.6	14.7	C-1, C-5, C-9, C-10	C-1, C-5, C-9, C-10
20	1.15, s	1.19, s	23.0	23.2	C-7, C-8, C-9, C-14, C-19	C-7, C-8, C-9, C-14, C-19
21	1.86, s	1.90, s	15.7	15.6	C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, MeOC12	C-11, C-12, C-13, C-14, C-15, MeOC12
MeOC2	3.36, s	3.46, s	58.6	57.8	C-2	C-2
MeOC12	3.55, s					
HOC3	3.54, d, 3.7	3.64, s	60.0	59.6	C-12	C-12

^a In (A;B) systems, non-equivalent protons have been identified as (a;b) or (ax;eq) when possible.

2.5. *In vitro* antimalarial activity assays

Cultures of W2 chloroquine resistant strain of *P. falciparum* were carried out using a modified [^3H]hypoxanthine-uptake *in vitro* on glucose-enriched RPMI 1640 medium supplemented with 10% human serum at 37°C (Le Bras and Deloron, 1983; Benoit et al., 1996). The malaria-infected erythrocytes were plated at 3% parasitaemia (5% hematocrit) with ^3H -hypoxanthine (Amersham, London) (0.8 mCi), in 96 well microtiter plates, and incubated for 48 h at 37°C and 5% of CO_2 in the presence of compounds at decreasing concentrations. Afterward, microtiter plates were frozen–defrosted and each well was harvested onto a glass fiber filter. The incorporated ^3H -hypoxanthine was then determined with a beta-counter. Controls were performed to assess the background (negative control) and the parasite growth (positive control). Growth curves were obtained and the concentration required to inhibit growth by 50% (IC_{50}) was determined graphically by plotting concentration versus percentage inhibition. Pharmacological profile of the strain is described in supporting information section.

2.6. *In vitro* cytotoxicity study

Human breast adenocarcinoma (MCF-7) cells were cultured in DMEM culture medium containing 2 mM L-glutamine (Lonza, Emerainville, France) supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) (Lonza) and incubated under standard conditions (37°C, 5% CO_2). Vero cells were cultured in EMEM culture medium (Lonza) containing 2 mM L-glutamine (Lonza), 2 mM non-essential amino acids (Lonza), 2 mM sodium pyruvate (Lonza) and supplemented with 10% foetal calf serum (FCS) (Lonza). All experiments were carried out using cells in the exponential phase of growth. Cells were trypsinized, resuspended in medium and seeded (20,000 cells/well) in 96-well plates. After 24 h the medium was replaced by fresh medium containing the molecules under evaluation at concentrations ranging from 0.01 to 100 $\mu\text{g}/\text{mL}$. Plates were incubated at 37°C in 5% CO_2 , 95% air mixture for 24 h, at which point 20 μL (8000 Bq/well) of ^3H -hypoxanthine (PerkinElmer, France) were

added to each well. The plates were incubated for an additional 24 h. The experiment was terminated by freezing the plates at -20°C . Plates were then defrosted and each well was harvested on a fiberglass filter. After the addition of scintillant (Betaplate Scint SC/9200/21, 1205/440, Wallac PerkinElmer) the incorporated radioactivity is counted and IC_{50} values were determined graphically from the dose–response curves. SDS (10% solution in water) was used as control.

3. Results and discussion

Seven quassinoids have been isolated and characterized in the herbal tea made with young fresh leaves. These are simalikalactone D (SkD, **1**), picrasin B (**2**), picrasin H (2-O-methylpicrasin B, **3**), neoquassin (**4**), quassin (**5**), picrasin I (**6**) and picrasin J (**7**) (Fig. 1).

In addition to SkD (**1**), picrasin B (**2**), quassin (**5**) and neoquassin (**4**) have already been isolated from natural sources (see for example Valenta et al., 1961; Hikino et al., 1975; Apers et al., 2002). Picrasin H (**3**) has already been prepared by synthesis by hydrogenation of quassin (Kawada et al., 1989) while picrasins I (**6**) and J (**7**) were isolated for the first time. Picrasins I–J were named after the closely related picrasin B. Picrasins I and J have been characterized unambiguously by 1D and 2D NMR experiments and high resolution mass spectrometry (HRMS) (Table 1). Relative stereochemistry at C-2 and C-3 could be assigned by the observation of strong NOESY correlations pointed out in Fig. 2.

Regarding compound **7** specifically, the NOE signal observed between H-19 and H-2, H-19 and H-4, H-19 and H-20, H-20 and H-6a showed that these protons are axial on cycles A and B, which therefore adopt a *trans*-decalone geometry. We could also observe a NOE signal between H-3 and H-4 and H-3 and H-2 indicating that H-3 has to be in an equatorial position. Further evidence for H-3 being equatorial is given by the small coupling constant with both neighboring protons (3.6, 1.8 Hz). The coupling constant at H-7 demonstrated that this proton stands in an equatorial position on ring B, allowing us to determine the geometry of the B–C ring junction. The NOE signal between H-9 and H-5 indicated that H-9 is in

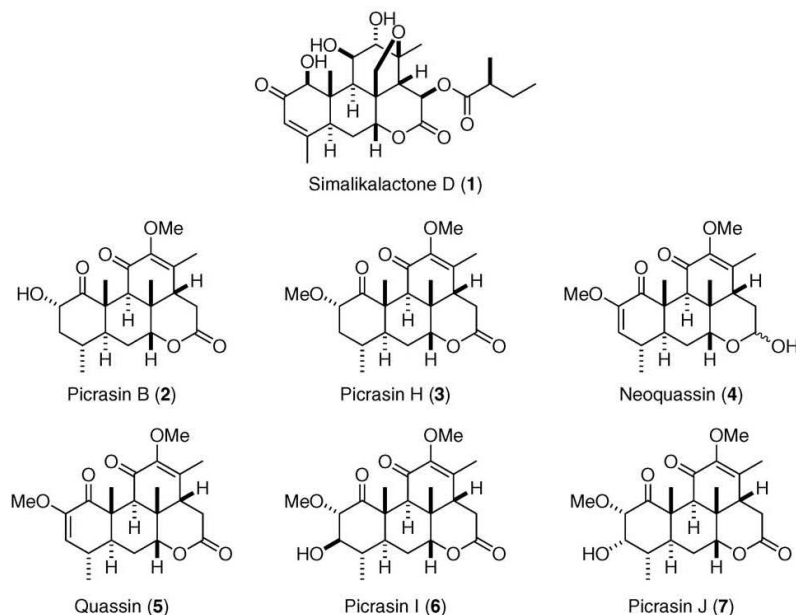


Fig. 1. Quassinoids isolated in *Q. amara* leaf tea.

Table 2

Concentration, cytotoxicity and antimalarial activity of leaf tea components.

	Concentration in tea (mg L ⁻¹) ^a	<i>P. falciparum</i> IC ₅₀ (μM)	Vero IC ₅₀ (μM)	MCF7 IC ₅₀ (μM)
SkD (1)	5.4 (7.8 ^b)	0.01	0.058	0.02
Picrasin B (2)	6.8	0.8	37	8.9
Picrasin H (3)	3.4	3.4	34	0.8
Neoquassin (4)	4.4	2.7	>160	59
Quassin (5)	3.4	2.8	80	n.d.
Picrasin I (6)	1.8	2.6	77	14
Picrasin J (7)	5.6	4.2	161	77
Doxorubicin			0.7	0.037

^a Based on isolated yield.^b In parenthesis, concentration measured by HPLC titration.

an axial position on ring B and allowed us to establish the geometry of the B/D ring junction.

For compound **6**, the NOE signal observed between H-19 and H-2 and H-19 and H-20 indicated the same *trans*-decaline geometry for ring A and B, with an axial position for H-2, H-19 and H-20. The NOE signal between H-20 and H-7 showed that H-7 is equatorial on ring B, and therefore, the junction between ring B and C has the same geometry as in compound **7**. H-3 is a broad triplet, with a coupling constant of 9.8 Hz, which indicated that H-2, H-3 and H-4 are in an axial position on ring A. The NOE signal between H-18 and H-5 demonstrated that H-5 is axial on ring A. The stereochemistry for H-9 could not be well established because of the lack of NOE signal for it. We assumed that its stereochemistry was the same as for compound **7** because of the similarity of H-9 and C-9 chemical shifts for both compounds.

In addition, it can be pointed out that H-3 protons have very different chemical shifts in **6** and **7** ($\Delta\delta = 1.25$ ppm), further suggesting that these two compounds are epimers at C-3.

All compounds isolated from *Q. amara* young leaves tea were submitted to antimalarial tests *in vitro* against *P. falciparum* (Table 2). SkD was the most active (IC₅₀ = 10 nM) as described previously (Bertani et al., 2006). Picrasin B is the second most active ingredient against the parasite; it is 80 times less active than SkD (IC₅₀ = 0.8 μM). The other constituents of the herbal tea prevent 50% of the growth of the parasite *in vitro* at concentrations ranging from 2.6 to 4.2 μM. Since the concentrations of the different ingredients of the herbal tea are all of the same order of magnitude, SkD may be considered as solely responsible for the antimalarial activity. In the past, SkD has been evaluated for anticancer, antiviral, antimalarial and antileishmanial activities (O'Neill et al., 1986;

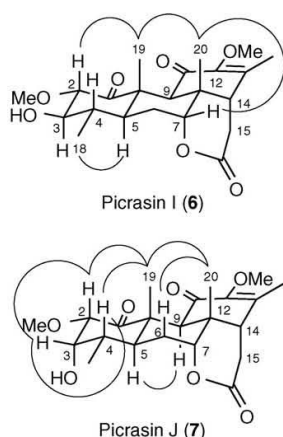
Cabral et al., 1993; Ozeki et al., 1998; Xu et al., 2000; Apers et al., 2002; Muhammad et al., 2004; Guo et al., 2005; Muhammad and Samoylenko, 2007) and was claimed to be cytotoxic often at nanomolar concentrations on cancer cell lines [for example: 37 and 6 nM on KB cells (O'Neill et al., 1986; Xu et al., 2000), 29 nM on MCF7 cell (Xu et al., 2000), 11 nM on P-388 cells (Ozeki et al., 1998), and only 4.8 μM against Vero cells (Muhammad et al., 2004)]. In our hands, SkD was toxic to MCF7 (IC₅₀ < 20 nM) as previously published, and surprisingly, also to Vero cells (IC₅₀ = 58 nM).

Consequently, SkD may be considered as the constituent of this preparation which is responsible for the antimalarial activity of the herbal tea, but also for its possible toxicity. We have measured by HPLC that its concentration in the herbal tea is 7.8 mg L⁻¹. In the context of a recommended administration of a herbal tea at a dose of 4 × 150 mL/day, a daily dose of herbal tea would correspond to ingest 4.7 mg SkD, that is to say 78 μg/kg for a 60-kg adult. At such a dose, the herbal tea effectively induced significant reduction of *in vivo* parasitemia in mice infected by *P. yoelii yoelii* (Bertani et al., 2007).

Regarding the hypothetical toxicity of SkD, a phase I clinical study was conducted in 66 patients with various types of advanced solid tumours, using another cytotoxic quassinoid bruceantin, at doses up to 4.5 mg/m²/day for 5 days (i.e., 0.15 mg/kg/day) (Bedikian et al., 1979). Structurally related to SkD, bruceantin also displayed similar *in vitro* biological activities: a strong antiplasmodial activity together with cytotoxicity on various cell lineages (O'Neill et al., 1986; Muhammad and Samoylenko, 2007, and references cited therein). In the clinical study, hypotension, nausea, and vomiting were common side effects at doses up to 75 μg/kg/day, and haematological toxicity manifested mainly as thrombocytopenia at the highest dose of 150 μg/kg/day. If we consider that a similar pattern of toxicity should be observed between both these products, the administration of 78 μg/kg/day of SkD may be assumed as harmful to patients.

4. Conclusions

To conclude, an in-depth study of the composition of a *Q. amara* herbal tea prepared from young and fresh leaves for optimizing its antimalarial activity has enabled us to isolate and to characterize six quassinoids other than SkD. Two of these molecules are new, and one is described for the first time as a natural product. None of these quassinoids has a significant activity on *in vitro* culture of *P. falciparum* or on cellular lineage in mammals. The activity of this herbal tea hence appears strongly correlated to its SkD contents. However, in the context of an antimalarial treatment, the dose necessary for obtaining a curative antimalarial effect is close to the toxic dose of an SkD analogue, the bruceantin. At therapeutic doses, this preparation may be suspected as harmful. Indeed prior to emitting a definitive conclusion on the recommendation of use of such herbal tea, a clinical study in humans

**Fig. 2.** Significant NOE correlations in picrasins I (**6**) and J (**7**).

similar to the one done with bruceantin should be performed with SKD.

Appendix A. Supplementary data

Supplementary data associated with this article can be found, in the online version, at doi:10.1016/j.jep.2009.07.037.

References

- Apers, S., Cimanga, K., Van den Berghe, D., Van Meenen, E., Otshudi Longanga, A., Foriers, A., Vlietinck, A., Pieters, L., 2002. Antiviral activity of simalikalactone D, a quassinoid from *Quassia africana*. *Planta Medica* 68, 20–24.
- Bedikian, A.Y., Valdivieso, M., Bodey, G.P., 1979. Initial clinical studies with bruceantin. *Cancer Treatment Reports* 63, 1843–1847.
- Benoit, F., Valentin, A., Pélissier, Y., Diafouka, F., Marion, C., Kone-Bamba, D., Koné, M., Mallié, M., Yapo, A., Bastide, J.-M., 1996. In vitro antimalarial activity of vegetal extracts used in West African traditional medicine. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 54, 67–71.
- Bertani, S., Bourdy, G., Landau, I., Robinson, J.-C., Esterre, P., Deharo, E., 2005. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 45–54.
- Bertani, S., Houël, E., Stien, D., Chevolut, L., Jullian, V., Garavito, G., Bourdy, G., Deharo, E., 2006. Simalikalactone D is responsible for the antimalarial properties of an Amazonian traditional remedy made with *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *Journal of Ethnopharmacology* 108, 155–157.
- Bertani, S., Houël, E., Bourdy, G., Stien, D., Jullian, V., Landau, I., Deharo, E., 2007. *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) leaf tea: effect of the growing stage and desiccation status on the antimalarial activity of a traditional preparation. *Journal of Ethnopharmacology* 111, 40–42.
- Cabral, J.A., McChesney, J.D., Milhous, W.K., 1993. A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. *Journal of Natural Products* 56, 1954–1961.
- Chaud, P., Paquet, C., Huguet, P., Cottrelle, B., 2006. Surveillance épidémiologique du paludisme en Guyane. *Institut de Veille Sanitaire Cayenne*, 2-11-095765-5 http://www.invs.sante.fr/publications/2006/paludisme_guyane/paludisme_guyane.pdf.
- Guo, Z., Vangapandu, S., Sindelar, R.W., Walker, L.A., Sindelar, R.D., 2005. Biologically active quassinoids and their chemistry: potential leads for drug design. *Current Medicinal Chemistry* 12, 173–190.
- Hikino, H., Ohta, T., Takemoto, T., 1975. Picrasins, simaroubolides of Japanese quassia tree *Picrasma quassioides*. *Phytochemistry* 14, 2473–2481.
- Kawada, K., Kim, M., Watt, D.S., 1989. A partial synthesis of picrasin B and Δ^2 -picrasin B. *Tetrahedron Letters* 30, 5985–5988.
- Kim, M., Kawada, K., Gross, R.S., Watt, D.S., 1990. An enantioselective synthesis of (+)-picrasin B, (+)- Δ^2 -picrasin B, and (+)-quassin from the R-(–) enantiomer of the Wieland-Miescher ketone. *Journal of Organic Chemistry* 55, 504–511.
- Le Bras, J., Deloron, P., 1983. In vitro study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-micro test. *American Journal of Tropical Medicine and Hygiene* 32, 447–451.
- Muhammad, I., Bedir, E., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Khan, I.A., Takamatsu, S., Pelletier, J., Walker, L.A., 2004. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. *Journal of Natural Products* 67, 772–777.
- Muhammad, I., Samoylenko, V., 2007. Antimalarial quassinoids: past, present and future. *Expert Opinion on Drug Discovery* 2, 1065–1084.
- O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C., Peters, W., Suffness, M., 1986. Plants as sources of antimalarial drugs: in vitro antimalarial activities of some quassinoids. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy* 30, 101–104.
- Ozeki, A., Hitotsuyanagi, Y., Hashimoto, E., Itokawa, H., Takeya, K., de Mello Alves, S., 1998. Cytotoxic quassinoids from *Simaba cedron*. *Journal of Natural Products* 61, 776–780.
- Valenta, Z., Papadopoulos, S., Podesva, C., 1961. Quassin and neoquassin. *Tetrahedron* 15, 100–110.
- Vigneron, M., Deparis, X., Deharo, E., Bourdy, G., 2005. Antimalarial remedies in French Guiana: a knowledge attitudes and practices study. *Journal of Ethnopharmacology* 98, 351–360.
- Xu, Z., Chang, F.-R., Wang, H.-K., Kashiwada, Y., McPhail, A.T., Bastow, K.F., Tachibana, Y., Cosentino, M., Lee, K.H., 2000. Anti-HIV agents 45 and antitumor agents 205. Two new sesquiterpenes, leitneridanins A and B, and the cytotoxic and anti-HIV principles from *Leitneria floridana*. *Journal of Natural Products* 63, 1712–1715.

4. Conclusion sur l'étude de préparations phytothérapeutiques à base de feuilles de *Q. amara* L.

Cette étude, qui s'inscrit dans le cadre des directives de l'OMS concernant l'évaluation des médecines traditionnelles en vue de leur intégration dans les politiques de santé dans le traitement du paludisme a permis :

- D'identifier le principe actif d'une infusion de jeunes feuilles fraîches de *Q. amara*, et d'en décrire la composition,
- De mettre en évidence le rôle fondamental de l'état de maturation et de dessiccation du matériel végétal dans le cadre de l'étude de préparations phytothérapeutiques,
- De souligner la nécessité d'études cliniques sur ce remède avant toute recommandation éventuelle d'usage.

Ainsi *Q. amara* (Figure 29) et les quassinoïdes, en particulier la simalikalactone D, présentent encore un potentiel non négligeable dans l'optique de nouveaux traitements du paludisme. Dans cet objectif, des travaux ont été effectués à la suite de cette thèse (contribution mineure) tels que l'isolement d'un nouveau quassinoid antipaludique, la simalikalactone E à partir des feuilles de *Q. amara* (Cachet *et al.*, 2009), ou l'étude des synergies entre la simalikalactone D et des substances actives de référence (Bertani *et al.*, New findings on quassinoid Simalikalactone D, a natural antimalarial product from *Quassia amara* L. (Simaroubaceae), soumis *Exp. Parasitology*).



Figure 29 : Feuilles, fleurs et fruits de *Quassia amara* L. (photographie G. Bourdy)

C. *Psidium acutangulum* DC. (Myrtaceae), un remède Wayana contre le paludisme – *Takamalaïmë, malaleja wajana epit*

1. *P. acutangulum* DC., un remède original du Haut-Maroni

P. acutangulum est une espèce de la famille des Myrtaceae, qui comporte près de 150 genres et plus de 3 800 espèces. Il s'agit d'arbres et d'arbustes (*Figure 30*), fréquemment producteurs d'huiles aromatiques, souvent originaires d'Australie, d'Asie du Sud-Est et d'Amérique tropicale (Gomes *et al.*, 2009; Wilson *et al.*, 2001). Cette famille possède une importance à la fois économique – bois d'*Eucalyptus* spp., huile essentielle de *Pimenta racemosa* (Mill.) Moore (bois d'Inde), épices (*Eugenia* sp., clou de girofle) ou fruits (*Psidium guajava* L.) – et écologique – présence dans des écosystèmes souvent menacés, et espèces dont les fruits représentent une part importante du régime alimentaire de certains primates et oiseaux (Atchinson, 1947; Lughadha et Proenca, 1996; Mabberley, 1997).



Figure 30 : Ecorce, feuilles et fleurs de *Syzygium australe* (Link) B. Hyland, une Myrtacée australienne

Le genre *Psidium* appartient au groupe des Myrtoïdes (Wilson *et al.*, 2005). L'espèce la plus connue reste *P. guajava*, d'où est issue la goyave, fruit riche en polyphénols antioxydants (Jimenez-Escrig *et al.*, 2001). Cette espèce est bien connue en médecine populaire dans tout le monde tropical pour son usage antidiarrhéique (Grenand *et al.*, 2004). En plus de cet usage, les fruits et les feuilles sont par exemple également utilisés au Bangladesh pour soigner la toux, les problèmes respiratoires et les rhumes, ainsi qu'en application sur les plaies (Hanif *et al.*, 2009). Ces applications peuvent être notamment liées aux propriétés antibactériennes, attribuables à la présence de flavonoïdes, dont la guaijaverine, et démontrées pour des extraits aqueux de feuilles et d'écorce (Geidam *et al.*, 2007; Rahim *et al.*, 2010). L'évaluation biologique d'un extrait méthanolique de feuilles a mis en évidence

des activités antidiarrhéiques, analgésiques, anti-inflammatoires et antipyrétiques. Ces deux derniers effets pourraient selon les auteurs expliquer l'utilisation traditionnelle au Nigéria de cette espèce en cas d'accès palustre (Olajide *et al.*, 1999). L'usage de *P. guajava* comme antipaludique au Nigéria est également relevé dans trois communautés du nord-est du pays, qui utilisent toutes les feuilles de cette espèce seules ou en mélange dans des préparations (Ene *et al.*, 2010). Dans le sud-ouest du pays, 12,5 % des 514 personnes interrogées ont également cité *P. guajava* (écorce) comme remède contre les fièvres (Ajaiyeoba *et al.*, 2003).

Psidium acutangulum (synonymes *P. peroonii* McVaugh, *P. guianense* Pers., *P. grandiflorum* Ruiz & Pav., *Britoa acida* (DC.) O. Berg) (Figure 31) est un arbuste ou petit arbre (6-8 m) indigène du nord de l'Amérique du Sud, commun sur les îlots rocheux des fleuves (da Silva *et al.*, 2003). L'huile essentielle de cette espèce a été étudiée, conduisant à l'identification de l' α -pinène (14,8 %), du 1,8-cinéole (12,9 %) et du β -pinène (10,1 %) comme constituants majoritaires (da Silva *et al.*, 2003). D'autres auteurs ont mis en évidence les propriétés anti-inflammatoires et analgésiques de cette huile (Santos *et al.*, 1997). A partir d'un extrait au dichlorométhane de feuilles de *P. acutangulum* présentant des propriétés antifongiques, un composé antimicrobien, la 3'-formyl-2',4',6'-trihydroxy-5'-méthyldihydrochalcone, a été isolée (Miles *et al.*, 1991). Cette molécule, isolée également des racines d'*Ampelocissus* sp. (Vitaceae) aux Philippines a été de plus mise en évidence comme inhibant de façon significative la croissance de cellules cancéreuses de différentes lignées cellulaires.



Figure 31 : Goiyave saut sur l'Oyapock (photo de gauche, arbustes à feuilles rouges au premier plan) - feuilles et fruit de *P. acutangulum* à Taluhwen (à droite, photographie Marie Fleury)

P. acutangulum est fréquent dans les bassins de l'Oyapock et du Maroni, mais absent ou rare dans les autres bassins fluviaux en Guyane française, et est connu sous les noms de *goiyave saut* (Créole), *liba goyaba* (Aluku) et *takamalaïmë* (Wayana). Les Créoles, Aluku et Wayäpi l'utilisent en décoction (écorce seule ou accompagnée des feuilles) en cas de diarrhée (Grenand *et al.*, 2004). Les Amérindiens Wayana des communes de Taluhwen et Antécume-Pata, sur le Haut-Maroni, décrivent

quant à eux un usage original de cette espèce. Une enquête réalisée dans le cadre du programme TRAMAZ sur 10 % de la population d'Antécume-Pata et 20 % de la population de Taluhwen a mis en évidence l'utilisation d'une décoction de feuilles et de tiges de *P. acutangulum* en cas d'accès palustre. Ce remède a été cité par 8 % des personnes interrogées à Taluwhen et 10 % à Antécume-Pata (Fleury, 2007). Cette étude présente donc un intérêt tout particulier car elle permettrait d'éclairer un usage déjà cité pour *P. guajava* mais jamais démontré à ce jour pour *P. acutangulum*, et spécifique à une communauté donnée dans un lieu précis de Guyane française. Une décoction de feuilles de *P. acutangulum* avait en effet été évaluée sur *P. falciparum* en 2005 mais sans donner, à la surprise des auteurs au vu des enquêtes menées sur le terrain, de résultats permettant de valider cet usage (Bertani *et al.*, 2005). Il a donc été décidé de poursuivre cette étude de façon plus approfondie.

2. Etude de préparations phytothérapeutiques à base de rameaux de *Psidium acutangulum* DC.

Dans le cadre de ce travail plusieurs lots de décoction ont été étudiés successivement. Les résultats obtenus lors des différentes étapes sont décrits dans les paragraphes ci-dessous.

Etude du lot MF2057

Une décoction réalisée à partir de 20 g de matériel végétal selon le protocole décrit par Marie Fleury (2007) a été soumise à des fractionnements successifs par extraction liquide – liquide, qui ont conduit à l'obtention de 4 fractions. Celles-ci ont été testées sur *Plasmodium falciparum* FcB1 (souche chloroquino-résistante), et les valeurs de CI_{50} suivantes ont été obtenues (*Tableau 1*). Les phases aqueuses PSI 1, PSI 3 et PSI 3A n'ayant pas été pesées au préalable, les résultats sont obtenus en termes de dilution et non de CI_{50} . Les dilutions sont faites de 2 en 2 dans la plaque dans le sens vertical ce qui signifie que dans le puit n° 8, le produit a été dilué au 1/128^{ème} par rapport à la concentration du premier puits.

Tableau 1 : Activités des fractions de *P. acutangulum* (lot MF2057) sur *P. falciparum* FcB1 (inactif : signifie dans ce cas que la CI_{50} n'a pas été atteinte même plus faible dilution de la fraction)

Fraction testée	CI_{50} (µg/ml) sur <i>P. falciparum</i> FcB1
PSI 1	inactif
PSI 2	0,3
PSI 3	inactif
PSI 3A	inactif
PSI 3B	5

Dans le cadre de ce test, la fraction obtenue après décoction (PSI 1) ne présente pas d'activité antiplasmodiale aux dilutions testées, mais ce résultat ne donne qu'une indication partielle, la CI₅₀ de la fraction n'ayant pas été calculée. Il n'est cependant pas contradictoire par rapport à celui obtenu sur le même lot de feuilles par Bertani *et al.* en 2005, qui avait conduit à la conclusion que ce remède, préparé à partir de 150 g de feuilles mises à bouillir dans 1 litre d'eau pendant 15 minutes, n'était pas actif contre *P. falciparum* (Bertani *et al.*, 2005). Le fractionnement de la décoction a cependant permis de mettre en évidence des extraits inhibant la croissance du parasite *in vitro*. La fraction présentant la meilleure activité antiplasmodiale dans le cadre de ce test est l'extrait au dichlorométhane PSI 2 avec une CI₅₀ de 0,3 µg/ml, ce qui est un excellent résultat, en particulier dans le cas d'un extrait non purifié. Pour comparaison, la CI₅₀ de la chloroquine obtenue sur cette souche est de 0,06 µg/ml. Lors de cette première étape, 6,2 mg de cette fraction ont été obtenus, soit un rendement de 0,03 % par rapport au poids de plante sèche extraite. L'analyse et le fractionnement de cet extrait ont donc été réalisés dans les étapes suivantes.

Le fractionnement de l'extrait PSI 2 en CLHP semi-préparative a été réalisé selon le profil suivant (Figure 32) et a permis d'obtenir 5 fractions numérotées de F1 à F5, F4 étant la fraction contenant le produit majoritaire en visible en UV :

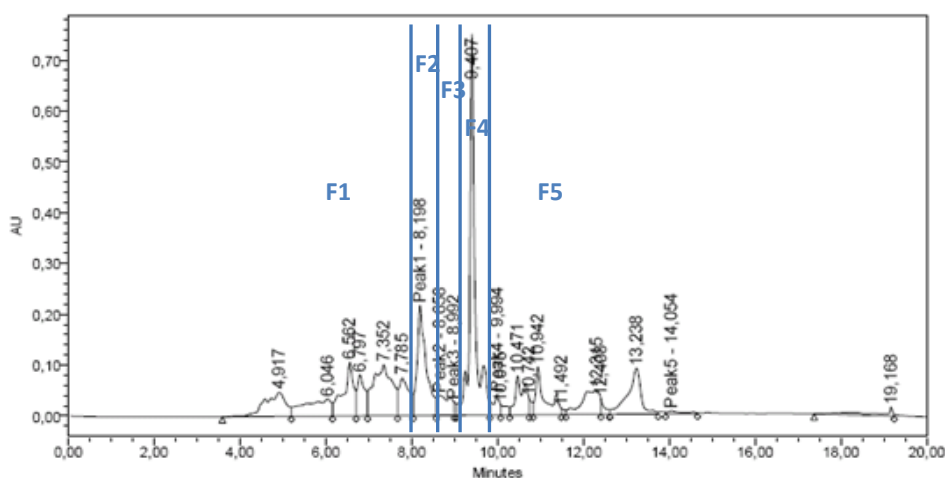


Figure 32 : Profil obtenu en CLHP semi-préparative pour le fractionnement de l'extrait PSI 2 de *P. acutangulum* (gradient eau / acétonitrile allant des proportions 80:20 à 0:100 en 10 minutes et maintenu à 100 % d'acétonitrile, colonne C18, débit 1 ml/min, détection UV 214 nm)

La fraction F4 obtenue suite à cette séparation avec un rendement de 39 % (2,3 mg obtenus) a été analysée en CLHP avec la même méthode, ce qui a permis de montrer que cette fraction n'était pas pure, mais composée d'au moins 2 produits différents qui se sont dégradés avant de pouvoir être analysés en RMN.

Les résultats obtenus sur *Plasmodium falciparum* ont été les suivants (Tableau 2):

Tableau 2 : Activités des fractions de *P. acutangulum* (lot MF2057) sur *P. falciparum*

Fraction testée	Cl ₅₀ (µg/ml) sur <i>P. falciparum</i> FcB1
F1	5
F2	< 1,25
F3	n.t.
F4	> 10
F5	> 10

La fraction F3 n'a pas été testée car les analyses en CLHP ont montrées que sa composition était identique à celle de la fraction F4. L'activité de cet extrait semble donc être principalement due aux produits contenus dans la fraction 2. Cependant, aucune information supplémentaire n'a pu être obtenue sur cette fraction, extraite avec un rendement de 5 %, à cause de la trop faible quantité de produit récupéré (0,3 mg).

La quantité de matériel végétal disponible pour ce lot ne permettant pas de réaliser une seconde décoction en quantité suffisante pour effectuer un nouveau fractionnement, l'étude n'a pu être poursuivie sur cet extrait. Les activités sur le parasite étant cependant très encourageantes, l'étude a été poursuivie sur d'autres lots de *Psidium acutangulum*.

Comparaison des lots MF2057 et MF2100

Les extraits directement réalisés avec des solvants organiques pour les deux lots ont été analysés en CLHP afin de comparer les profils obtenus pour deux récoltes différentes préalablement à toute évaluation de l'activité biologique :

- les profils des extraits bruts au dichlorométhane (*Figure 33*) sont totalement différents de ceux obtenus pour l'extrait dichlorométhane de la décoction étudiée précédemment. En particulier, on ne retrouve pas les produits correspondant aux fractions F2 et F4. De façon générale, les intensités des profils obtenus sont faibles, peu de molécules détectables en UV semblant avoir été extraites par cette méthode. Il est donc difficile d'effectuer une comparaison efficace des deux lots dans ce cas.

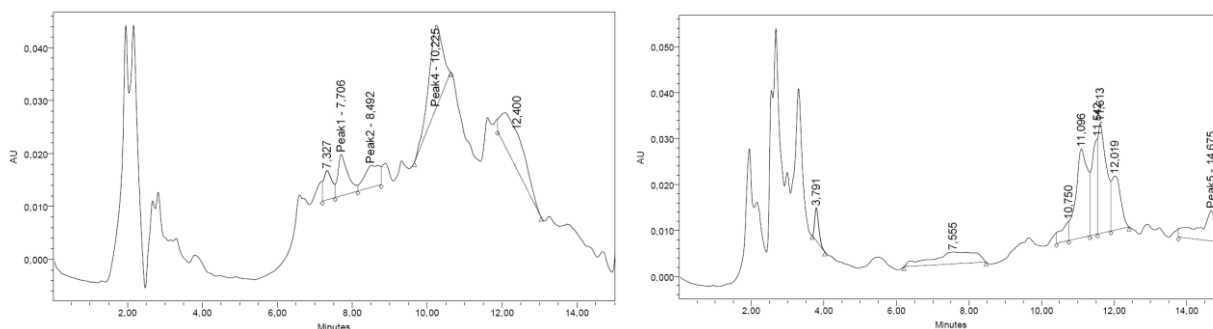


Figure 33 : Comparaison des profils obtenus en CLHP analytique pour les extraits au dichlorométhane des lots MF2057 (à gauche, solution de concentration 53 mg/ml) et MF2100 (à droite, solution de concentration 55 mg/ml) (gradient eau / acétonitrile allant des proportions 80:20 à 0:100 en 10 minutes et maintenu à 100 % d'acétonitrile, colonne C18, débit 1 ml/min, détection UV 214 nm, injection de 5 µl)

- les profils obtenus pour les extraits à l'acétate d'éthyle (Figure 34) sont qualitativement très similaires et dominés par un pic majoritaire. La différence de saison de récolte n'est donc pas visible par l'étude des extractibles obtenus à l'acétate d'éthyle, même si le lot MF2100 semble plus concentré en métabolites secondaires.

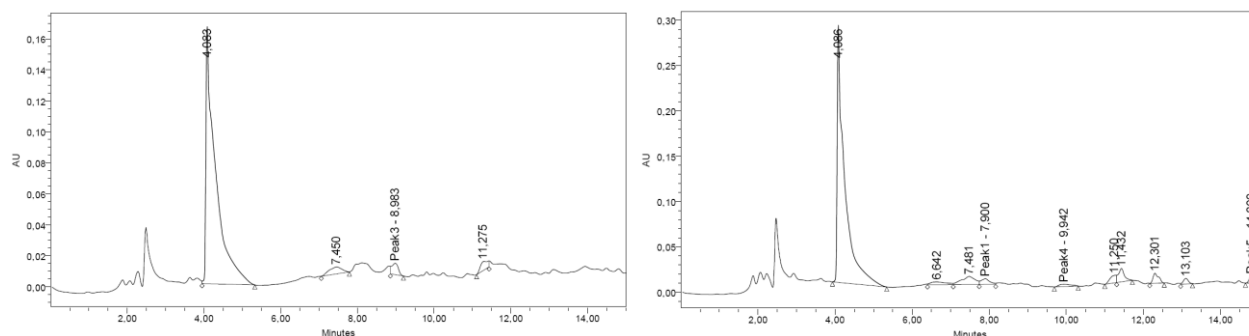


Figure 34 : Comparaison des profils obtenus en CLHP analytique pour les extraits à l'acétate d'éthyle des lots MF2057 (à gauche, solution de concentration 52 mg/ml) et MF2100 (à droite, solution de concentration 52 mg/ml) (gradient eau / acétonitrile allant des proportions 80:20 à 0:100 en 10 minutes et maintenu à 100 % d'acétonitrile, colonne C18, débit 1 ml/min, détection UV 214 nm, injection de 5 µl)

Au vu de ces analyses, il est donc possible que l'activité antiplasmodiale détectée dans le lot MF2057 soit également présente dans le lot MF2100. Afin de vérifier cette hypothèse, les décoctions des deux lots ont donc été préparées à partir de 2 g de plante, puis extraites au dichlorométhane. Les essais biologiques ont été effectués sur tous les extraits étudiés précédemment, et les résultats suivants ont été obtenus (Tableau 3) :

Tableau 3 : Comparaison des activités d'extraits de *P. acutangulum* sur *P. falciparum* - ¹D = extrait dichlorométhane, AE = extrait acétate d'éthyle, DC = décoction, DD = extrait dichlorométhane de la décoction

Fraction testée ¹	CI ₅₀ (µg/ml) sur <i>P. falciparum</i> FcB1
MF2057-D	5-10
MF2100-D	> 10
MF2057-AE	5-10
MF2100-AE	> 10
MF2057-DC	5-10
MF2100-DC	5-10
MF2057-DD	<< 1,25
MF2100-DD	> 10

Il apparait au vu des résultats obtenus sur *P. falciparum* que le second lot récolté, MF2100, ne présente aucune activité et ne peut donc être utilisé afin de reprendre le fractionnement amorcé avec MF2057. D'autres conclusions également peuvent être tirées de cette étude :

- l'extrait dichlorométhane de la décoction du lot MF2057 possède toujours une activité antiplasmodiale intéressante, le résultat obtenu lors de la première étude de ce lot est donc confirmé.
- la réalisation d'une extraction au solvant (dichlorométhane ou acétate d'éthyle) ne permet pas d'obtenir directement un extrait d'activité aussi intéressante : l'étape de la décoction semble donc fondamentale pour l'obtention d'un extrait actif. L'influence du mode d'extraction sur le contenu en métabolites secondaires de certains extraits a déjà été mise en évidence, par exemple dans le cas du contenu en polyphénols d'extraits de *Limoniastrum monopetalum* (L.) Boiss. (Plumbaginaceae) (Ksouri *et al.*, 2008) ou sur les métabolites secondaires extraits des algues (Cronin *et al.*, 1995). Il a également été démontré dans le cas d'*Artemisia annua* que la préparation en infusion ou en décoction permet d'obtenir des concentrations différentes en artémisinine (Willcox *et al.*, 2004).
- la période de récolte de la plante – et donc de fait son état de maturité – joue donc a priori un rôle important pour l'activité de la préparation. La variation de la composition en extractibles en fonction de la saison, du génotype, du lieu de culture, du mode de séchage a en effet été décrite (Bertani *et al.*, 2007; Mueller *et al.*, 2000; Willcox *et al.*, 2004), et il serait intéressant de relier cette donnée chimique aux données d'usage de ce remède par la population Wayana ou à des données écologiques sur la croissance de la plante.

Etude du lot MF2176

Extraction et fractionnement

Immédiatement après la récolte deux décoctions ont été réalisées à partir de la plante sèche dans un premier cas, et fraîche dans un second. En effet, dans le cas des préparations traditionnelles, les plantes sont plutôt utilisées fraîches par les populations concernées (Bourdy *et al.*, 2008). De plus, les études réalisées sur *Q. amara* ont montré que dans certains cas l'état de dessiccation du matériel végétal pouvait avoir une influence non négligeable sur l'activité des remèdes (Bertani *et al.*, 2007). Les tests réalisés sur *P. falciparum* (souche FcB1 chloroquino-résistante) ont montré une CI_{50} du même ordre de grandeur pour les deux décoctions : 21 $\mu\text{g/ml}$ pour la décoction issue de la plante fraîche, et 17 $\mu\text{g/ml}$ pour la décoction issue de la plante sèche. Pour des raisons pratiques dues aux difficultés de conservation de la plante fraîche entre le lieu de récolte et le laboratoire, l'étude a été poursuivie sur du matériel végétal sec.

Le protocole d'extraction a été modifié par rapport au travail effectué sur le lot MF2057. En effet dans ce premier cas l'extrait le plus actif était celui au dichlorométhane, mais une seconde extraction de la phase aqueuse à l'acétate d'éthyle conduisait tout de même à un extrait présentant une CI_{50} de 5 $\mu\text{g/ml}$. Afin de rassembler de façon plus efficace les molécules actives dans un seul extrait, l'acétate d'éthyle, solvant de polarité moyenne, a donc été choisi. Une extraction à l'hexane de la décoction est cependant préalablement effectuée afin de retirer les produits les plus apolaires. La décoction réalisée à partir de 50 g de matériel végétal a conduit à l'obtention de 11,1 mg d'extrait à l'hexane PSI C, soit un rendement de 0,02 % par rapport à la quantité de plante de départ. Suite à ce processus, 489 mg d'extrait PSI F ont également été obtenus, soit un rendement de 1 % en poids par rapport au matériel végétal sec extrait.

La décoction réalisée à partir des rameaux (tiges et feuilles) de *Psidium acutangulum* DC (PSI A) ainsi que les extraits successifs obtenus ont été testés sur la souche FcB1 de *Plasmodium falciparum*. Les CI_{50} suivantes ont été obtenues (Tableau 4) :

Tableau 4 : Activités des extraits de *P. acutangulum* (lot MF2176) sur *P. falciparum* FcB1

Fraction testée	CI_{50} ($\mu\text{g/ml}$) sur <i>P. falciparum</i> FcB1
PSI A (décoction)	4,2
PSI C (extrait à l'hexane)	45
PSI D (fraction aqueuse)	3,75
PSI E (fraction aqueuse)	26
PSI F (extrait à l'acétate d'éthyle)	< 1

La décoction a montré une activité antiplasmodiale non négligeable ($CI_{50} < 10 \mu\text{g/ml}$), confirmant ainsi l'intérêt d'une étude approfondie de ce remède traditionnel Wayana. La valeur de CI_{50}

obtenue est inférieure à celle relevée lors de la comparaison entre la plante sèche et la plante fraîche, mais ce résultat peut être expliqué par le fait que les décoctions testées sont issues de deux préparations différentes. Au cours des extractions successives, l'activité s'est confirmée, le meilleur résultat étant obtenu pour l'extrait à l'acétate d'éthyle PSI F. En parallèle, la cytotoxicité des extraits PSI A et PSI F a été évaluée sur cellules VERO, et dans les deux cas la valeur d'ED₅₀ mesurée était supérieure à 100 µg/ml, ce qui démontre que la décoction tout comme l'extrait à l'acétate d'éthyle ne présentent pas de toxicité sur cette lignée cellulaire. Le fractionnement de l'extrait PSI F a donc été poursuivi. Il a été réalisé en CLHP semi-préparative à partir du profil suivant (*Figure 35*):

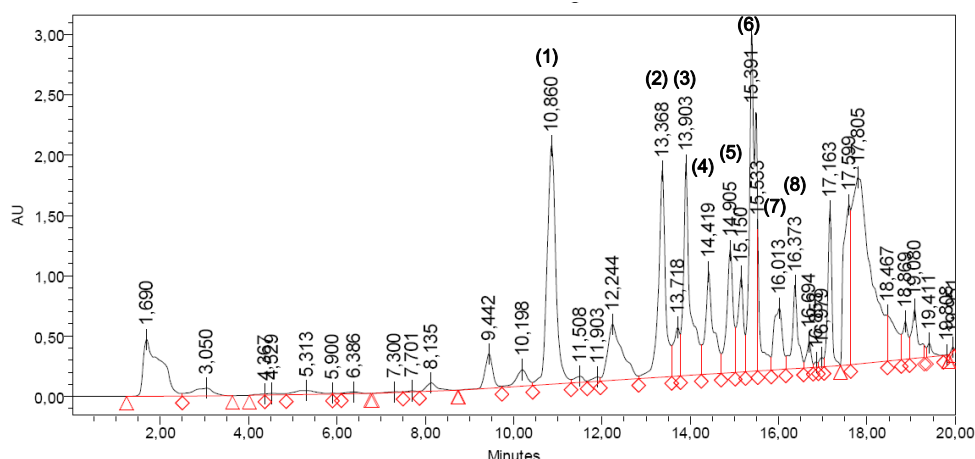


Figure 35 : Profil obtenu en CLHP semi-préparative pour le fractionnement de l'extrait PSI F de *P. acutangulum* (gradient eau / acétronitrile de 90:10 à 50:50 en 20 minutes, colonne C18, débit 15 ml/min, détection UV 214 nm)

Les fractions ont été collectées à partir de 10 minutes car un fractionnement bioguidé effectué préalablement avec la même méthode (*Figure 36*) avait permis de déterminer de façon large les zones d'activité antiplasmodiale. Il était cependant intéressant d'un point de vue purement phytochimique d'isoler et d'identifier également le produit correspondant au pic à 10,86 minutes.

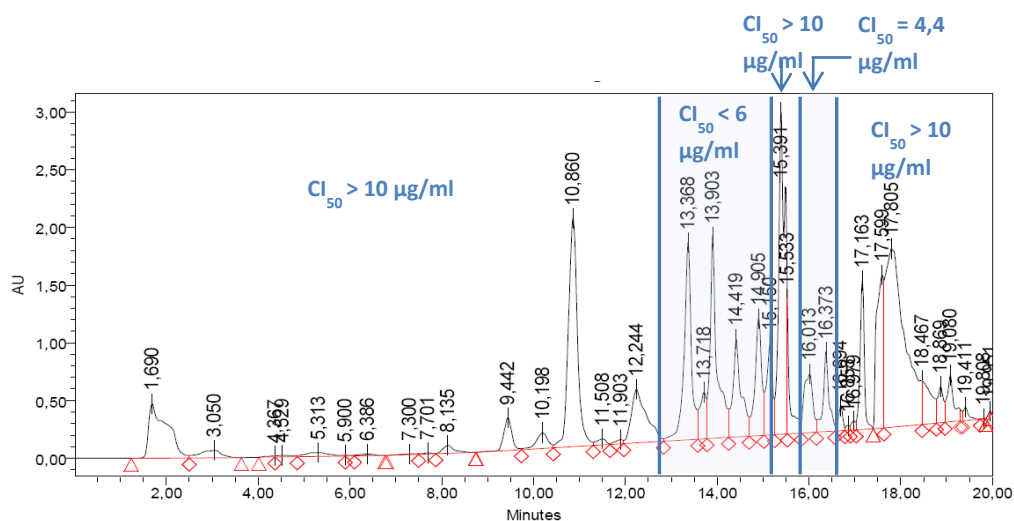


Figure 36 : Mise en évidence de l'activité antiplasmodiale des fractions de l'extrait PSI F sur le profil chromatographique

Il est intéressant de noter que les CI_{50} relevées pour les zones d'activité antiplasmodiale dans le cadre de ce fractionnement bioguidé préliminaire sont supérieures à 1 $\mu\text{g/ml}$, alors que la CI_{50} de l'extrait PSIF avait été mesurée comme $< 1 \mu\text{g/ml}$. En première approche, ce résultat pourrait être expliqué par une possible dégradation des produits lors du fractionnement réalisé, ou par la perte de certains produits lors de cette étape, les rendements d'extraction étant inférieurs à 100 %.

Une première séparation a permis d'obtenir 14 fractions, dont 4 produits purs : les molécules (1), (2), (3) et (8) (la numérotation a été effectuée dans l'ordre des temps d'élution). Un nouveau fractionnement en CLHP semi-préparative de l'une des fractions obtenues a permis d'isoler 4 nouvelles molécules, les produits (4), (5), (6) et (7). Huit produits purs (*Figure 37*) ont ainsi été isolés. Les mélanges ont également été conservés pour être testés sur la souche FcB1 afin d'effectuer un suivi exhaustif de l'activité antiplasmodiale. Les rendements d'extraction par rapport à l'extrait PSI F sont indiqués entre parenthèses. Le rendement total d'extraction par rapport à PSI F suite au premier fractionnement est de 67,5 %, soit un rendement de 0,68 % par rapport au matériel végétal. Le rendement d'extraction du second fractionnement (celui des fractions HIJ rassemblées) est de 28,5 %.

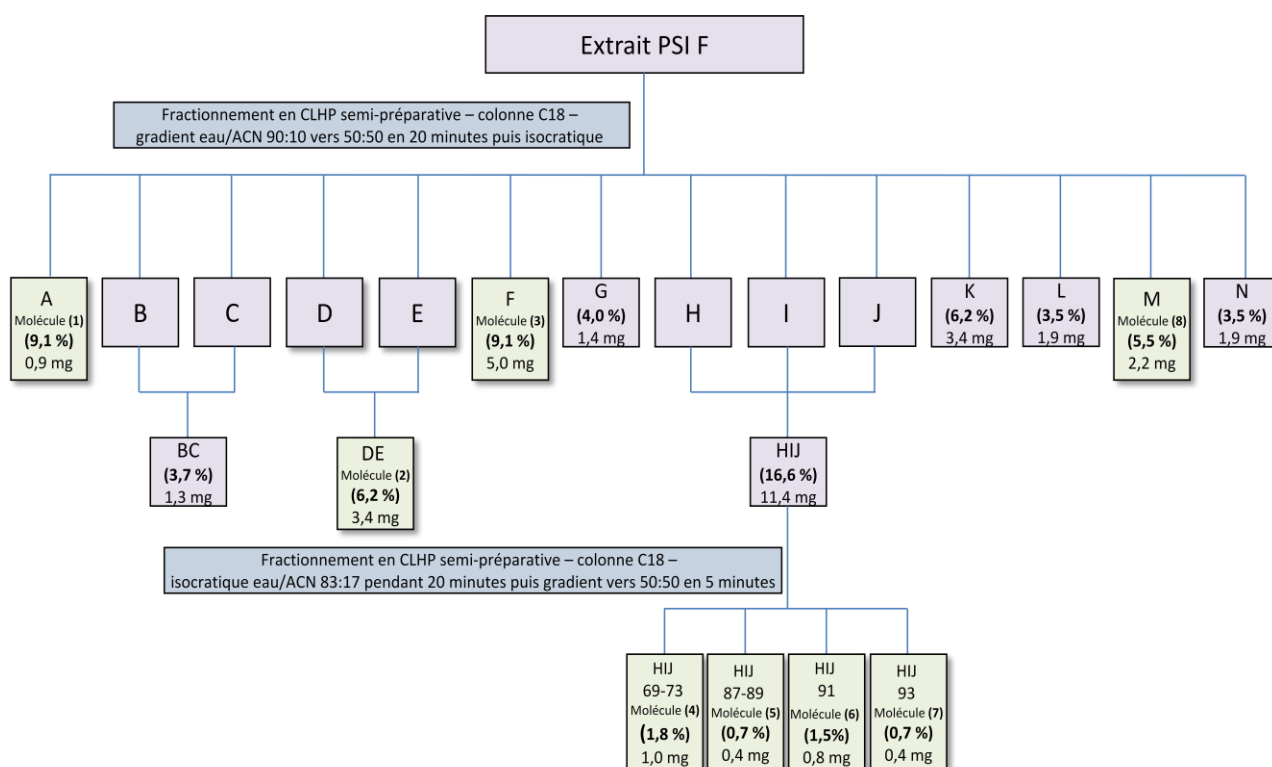


Figure 37 : Bilan des fractions et molécules pures obtenues à partir de l'extrait PSI F de P. acutangulum – Les rendements après extraction sont indiqués en gras par rapport à l'extrait PSI F et la quantité de molécule isolée disponible pour les analyses chimiques et biologiques est indiquée en mg.

Analyse structurale des composés isolés

Parmi ces composés, six d'entre eux ont pu être identifiés par l'analyse des données obtenues en RMN et par comparaison avec les données de la littérature (*Figure 38*). Les produits identifiés sont tous, en dehors de la catéchine, des flavonols glycosylés en position 3. Les molécules **(2)** et **(8)** n'ont à ce jour pas encore été identifiées, la quantité de produit disponible pour l'analyse par RMN étant insuffisante. Les quelques éléments structuraux identifiables conduisent cependant à penser qu'il s'agit également de flavonoïdes glycosylés. Les spectres de RMN sont décrits dans les tableaux suivants (*Tableaux 5-10*) et sont présentés en Annexe (Annexes 7-12) ainsi que les fiches descriptives des produits isolés.

Les pouvoirs rotatoires des molécules ont été mesurés lorsque la quantité de produit disponible le permettait. La littérature donne cependant une valeur différente pour l'avicularine, avec un pouvoir rotatoire de $-156,2^\circ$ (valeur expérimentale -56°) mesuré dans les mêmes conditions. Les spectres de RMN des signaux correspondant aux protons et aux atomes de carbone sont cependant identiques pour cette molécule à ceux décrits dans notre étude (Mechikova *et al.*, 2008). Les valeurs des pouvoirs rotatoires mesurées pour les molécules **(2)** et **(8)** sont respectivement de 318° et -40° .

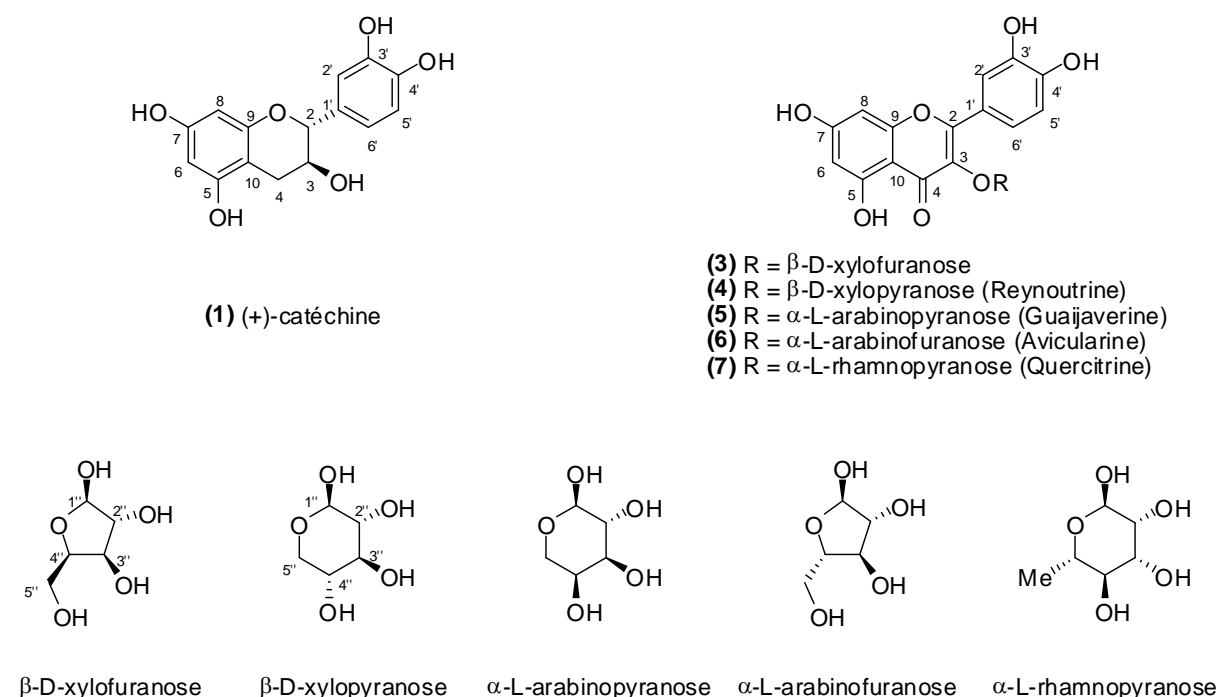


Figure 38 : Composés isolés dans l'extrait à l'acétate d'éthyle de rameaux de *P. acutangulum*

Catéchine **(1)**

Ce composé identifié comme la (+)-catéchine a été décrit d'après l'analyse des données ci-jointes (*Tableau 5*) et la comparaison avec les données de la littérature (Davis *et al.*, 1996; Lu et Yeap Foo, 1999; Watanabe, 1998). En particulier, les signaux des protons aromatiques de la molécule isolée correspondent bien à ceux de la catéchine. Les trois protons aromatiques à 6,89 ; 6,79 et 6,75

ppm indiquent en effet la présence d'un cycle 1,3,4-trisubstitué, les valeurs des constantes indiquant bien un couplage en position *mé*ta entre les protons 2' et 6', un couplage en position *ortho* entre les protons 5' et 6', et deux couplages, un en position *ortho* (8,2 Hz) et un en position *mé*ta (2,0 Hz) pour le proton 6'. De plus, les deux signaux à 5,88 et 6,02 ppm sont cohérents par rapport à l'existence du cycle 1,2,3,9-tétrasubstitué de la catéchine, la constante de couplage de 2,3 Hz caractéristique d'un couplage en *mé*ta des deux protons étant clairement observée. Malgré le fait que l'analyse ait été effectuée dans l'acétone-d₆, les groupements hydroxyles de la molécule n'ont pas été observés.

Tableau 5 : Déplacements chimiques (δ) et couplages homonucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) et hétéronucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) dans l'acétone-d₆ pour la (+)-catéchine (1)

Position	^1H : δ (ppm); multiplicité; J (Hz)	^{13}C : δ (ppm) d'après les analyses HSQC et HMBC ; mult.	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	COSY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)
2	4,56 ; d ; $J = 7,8$ Hz ; 1H	83,5 ; CH	C3, C4, C1', C2', C6'	H3
3	3,99 ; td, $J = 7,8$; 5,5 Hz ; 1H	69,1 ; CH		H2, H4a, H4b
4a	2,91 ; dd ; $J = 16,1$; 5,5 Hz ; 1H	29,6 ; CH ₂	C2, C3, C5, C10	H3
4b	2,53 ; dd ; $J = 16,1$; 8,5 Hz ; 1H			H3
5		157,7 ; C		
6	6,02 ; d ; $J = 2,3$ Hz ; 1H	96,9 ; CH	C7, C8, C10	
7		158,2 ; C		
8	5,88 ; d ; $J = 2,3$ Hz ; 1H	96,2 ; CH	C5, C6, C10	
9		156,9 ; C		
10		101,3 ; C		
1'		132,9 ; C		
2'	6,89 ; d ; $J = 2,0$ Hz ; 1H	116,0 ; CH	C2, C4', C6'	
3'		146,3 ; C		
4'		146,3 ; C		
5'	6,79 ; d ; $J = 8,2$ Hz ; 1H	116,5 ; CH	C1', C3'	
6'	6,75 ; dd ; $J = 8,2$; 2,0 Hz ; 1H	120,8 ; CH	C2, C2', C4'	

Quercitine-3-*O*- β -D-xylofuranoside (3)

Par analyse des données des spectres de RMN (*Tableau 6*) et comparaison avec la littérature, cette molécule a pu être identifiée comme la quercitine-3-*O*- β -D-xylofuranoside. Les signaux des protons aromatiques relevés pour la partie aglycone de cette molécule correspondent bien aux déplacements et couplages caractéristiques du squelette quercitine (Fraisie *et al.*, 2000), les corrélations en HMBC permettant de confirmer cette structure. Les trois protons aromatiques à 7,56 ; 6,73 et 7,54 indiquent la présence d'un cycle 1,3,4-trisubstitué, même si la résolution des signaux ne permet pas ici d'observer les constantes de couplage entre ces protons. Les deux signaux à 6,34 et 6,18 ppm des protons du cycle 1,2,3,9-tétrasubstitué des flavonoïdes sont visibles, même si la constante de l'ordre de 2 Hz caractéristique d'un couplage en *mé*ta des deux protons n'a pu être observée ici. Les corrélations entre les protons H6 et H8 n'ont pas été relevées, la différenciation avec le signal de la diagonale étant peu évidente.

La comparaison avec les données de la littérature (Moravcova *et al.*, 1997; Saxena et Chaturvedi, 1992; Xue *et al.*, 2006) a permis de déterminer la nature et la stéréochimie du sucre associé au squelette quercitine, aucune description de l'intégralité de cette molécule n'ayant été trouvée dans la littérature. Le proton à 5,20 ppm est identifié comme le proton anomérique du sucre porté par la molécule, du fait de son déplacement chimique caractéristique. Le signal qui lui est associé est un doublet de constante de couplage 7,3 Hz, indiquant donc que l'aglycone de la molécule ainsi que le groupement hydroxyle en position 2'' sont en position *trans* (sucre en configuration β). La corrélation observée en COSY entre le proton anomérique et le multiplet à 3,49 ppm ne permet pas d'identifier clairement le proton voisin (H2'') parmi les trois protons du massif. Les corrélations observées en HMBC entre ce multiplet et les atomes de carbones C1'' (atome de carbone anomérique) à C4'' permettent cependant de reconstituer le squelette furanose du sucre. Les déplacements chimiques relevés en HSQC pour les atomes de carbones C2'', C3'', C4'' et C5'' sont attribués d'après la littérature. La forme furanose est de plus indiquée par l'isochromie des protons H5'' (Vvedenskaya *et al.*, 2004).

Tableau 6 : Déplacements chimiques (δ) couplages homonucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY) et hétéronucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) dans le CD_3OD pour la quercitine-3-O- β -D-xylofuranoside (3) ; $[\alpha]_{\text{D}}^{27} = 384$ (c 0,208 ; CH_3OH)

Position	^1H : δ (ppm); multiplicité; J (Hz)	^{13}C : δ (ppm) d'après les analyses HSQC et HMBC ; mult.	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	COSY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)
2		159,1 ; C		
3		135,4 ; C		
4		? ; C		
5		158,0 ; C		
6	6,34 ; s ; 1H	94,5 ; CH	C5, C7, C8, C10	
7		165,8 ; C		
8	6,18 ; s . 1H	99,7 ; CH	C6, C7, C9, C10	
9		162,6 ; C		
10		105,2 ; C		
1'		122,7 ; C		
2'	7,56 ; s . 1H	117,0 ; CH	C2, C3', C4', C6'	
3'		145,5 ; C		
4'		149,4 ; C		
5'	6,73 ; m ; 1H	115,8 ; CH	C1', C3', C4'	H6'
6'	7,54 ; d ; $J = 8,4$ Hz ; 1H	123,3 ; CH	C2', C4'	H5'
1''	5,20 ; d ; $J = 7,3$ Hz ; 1H	104,0 ; CH	C3	3,49; m
2''		75,6 ; CH		
3''	3,49 ; m ; 3H	71,3 ; CH	C1'', C2'', C3'', C4''	H1''
4''		77,9 ; CH		
5'' <i>a</i>				
5'' <i>b</i>	4,30 ; m ; 2H	64,1 ; CH ₂		

Par analyse des données des spectres de RMN (*Tableau 7*) et comparaison avec la littérature, cette molécule a pu être identifiée comme la quercitine-3-*O*- β -D-xylopyranoside, ou reynoutrine. La présence de cette molécule a été décrite dans de nombreuses plantes dont des Myrtaceae comme *Syzygium samarangense* (Bloom) Merr. et L.M. Perry (Simirgiotis *et al.*, 2008) ou *Siphoneugena densiflora* Berg (Gallo *et al.*, 2006), et dans produits végétaux, comme le marc de pomme (Garcia *et al.*, 2009). Le squelette quercitrine est toujours bien caractérisé par les déplacements chimiques des protons aromatiques, les constantes caractéristiques d'un couplage en position para entre les protons 2' et 5' ($J = 0,5$ Hz) étant même visibles sur le spectre de RMN dans ce cas. Comme dans le cas de la molécule précédente, les corrélations en COSY entre les protons H6 et H8 n'ont pas été relevées pour cause de manque de clarté du signal à proximité de la diagonale.

Concernant le sucre associé à la molécule, le proton anomérique H1'' à 5,13 ppm est caractérisé par une constante de couplage de 7,2 Hz indiquant encore une fois un sucre en configuration β . Cette constante est également mesurée dans un des doublets du signal à 3,51 ppm, qui est donc attribué au proton H2'', en configuration axiale, la constante de couplage étant dans la gamme des valeurs caractéristiques (entre 6 et 14 Hz). L'attribution de ce proton H2'' est confirmée par une interaction visible en COSY entre les signaux à 5,13 et 3,51 ppm. L'attribution du proton H3'' est également faite grâce à la constante de couplage de 8,8 Hz commune aux signaux des protons H2'' et H3'', ainsi qu'à une corrélation visible en COSY. La multiplicité du signal à 3,39 ppm (triplet large) indique que le proton H3'' couple de façon équivalente avec ses deux voisins, et que ceux-ci sont donc placés dans la même configuration, c'est-à-dire en position axiale, comme confirmé par la valeur de la constante de couplage mesurée ici (8,6 Hz). Encore une fois les corrélations COSY entre le signal observé à 3,39 ppm et H2'' confirment que ce signal est bien celui de H''3. Aucune corrélation en COSY ne permet de relier directement les protons H3'' et H4'', mais ces corrélations sont cependant visibles entre le proton H4'' et les deux protons H5''. L'étude des constantes de couplage des protons H5'' permet de mettre en évidence que celui correspondant au signal à 3,78 ppm est caractérisé par un couplage axial-équatorial ($J = 5,1$ Hz) alors que le proton correspondant au signal à 3,10 ppm se caractérise par un couplage axial-axial ($J = 9,5$ Hz). Le proton H4'' ayant été déterminé comme placé en position axiale, celui à 3,78 ppm est donc le H5''*eq* et celui à 3,10 ppm le H5''*ax*. Il est de plus logique que le proton en position équatoriale ait un déplacement chimique plus élevé en valeur absolue car il est soumis à un effet de champ dû aux électrons des liaisons du cyclohexane tendant à le déblinder, alors que le proton en axial, nettement à l'extérieur du cycle, ne subit pas cet effet. Cette stéréochimie est confirmée par les corrélations observées en NOESY (*Figure 39*). Les déplacements chimiques des atomes de carbone du sucre sont cohérents par rapport à ceux décrits dans la littérature pour la reynoutrine (Lu et Yeap Foo, 1997), et l'enchaînement ainsi que la stéréochimie des atomes de carbone et d'hydrogène du sucre associé à

la molécule correspondent parfaitement à la description faite pour le β -D-xylopyranose des molécules isolées de *Pittosporum pancheri* Brongn. & Gris (Pittosporaceae) (Eparvier *et al.*, 2007) et de *Ruscus hypophyllum* L. (Liliaceae) (Mimaki *et al.*, 2008).

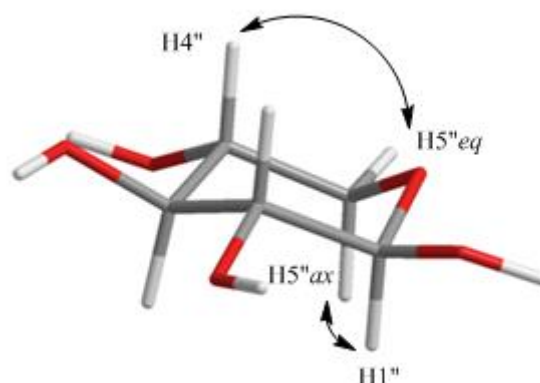


Figure 39 : Interactions NOE importantes pour déterminer la structure du β -D-xylopyranose de la reynoutrine

Tableau 7 : Déplacements chimiques (δ) couplages homonucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY et NOESY) et hétéronucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) dans le CD_3OD pour la quercitine-3- O - β -D-xylopyranoside (reynoutrine) (4)

Position	^1H : δ (ppm); multiplicité; J (Hz)	^{13}C : δ (ppm) d'après les analyses HSQC et HMBC ; mult.	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	COSY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)	NOESY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)
2		158,0 ; C			
3		134,9 ; C			
4		? ; C			
5		158,4 ; C			
6	6,32 ; d ; $J = 2,1$ Hz ; 1H	95,2 ; CH	C5, C8, C10	H8	
7		? ; C			
8	6,14 ; d ; $J = 2,1$ Hz ; 1H	100,7 ; CH	C10	H6	
9		? ; C			
10		104,1 ; C			
1'		122,6 ; C			
2'	7,60 ; dd ; $J = 2,1$; 0,5 Hz ; 1H	116,8 ; CH	C1', C4', C2		
3'		145,7 ; C			
4'		149,6 ; C			
5'	6,85 ; dd ; $J = 8,2$; 0,5 Hz ; 1H	115,7 ; CH	C1', C3', C4'	H6'	H6'
6'	7,59 ; dd ; $J = 8,2$; 2,1 Hz ; 1H	123,0 ; CH	C2', C3', C4', C2	H5'	H5'
1''	5,13 ; d ; $J = 7,2$ Hz ; 1H	104,6 ; CH	C3	H2''	H5''ax
2''	3,51 ; dd ; $J = 8,8$; 7,2 Hz ; 1H	75,0 ; CH	C1'', C3''	H1'', H3''	
3''	3,39 ; brt ; $J = 8,6$ Hz ; 1H	77,4 ; CH	C2'', C4''	H2''	
4''	3,51 ; m ; 1H	70,8 ; CH	C3''	H5''ax, H5''eq	H5''eq
5''ax	3,10 ; dd ; $J = 11,7$; 9,5 Hz ; 1H	66,9 ; CH_2	C1'', C4''	H5''eq, H4''	H1'', H5''eq
5''eq	3,78 ; dd ; $J = 11,7$; 5,1 Hz ; 1H		C1'', C3'', C4''	H5''ax, H4''	H4'', H5''ax

Par analyse des données des spectres de RMN et comparaison avec la littérature, cette molécule a été identifiée comme la quercitrine-3-*O*- α -L-arabinopyranoside, ou guaijaverine. Cette molécule, souvent isolée de façon simultanée avec la reynourrine, l'avicularine et la quercitrine (An *et al.*, 2005; Lu et Yeap Foo, 1997; Nunes *et al.*, 2010; Simirgiotis *et al.*, 2008; Vvedenskaya *et al.*, 2004) est un constituant des feuilles de *P. guajava* (Prabu *et al.*, 2006). Comme pour les molécules précédentes, le squelette quercitrine est clairement identifiable.

De la même façon que pour la molécule précédente, la structure du sucre peut être décrite par analyse des signaux observés en RMN du proton et aux corrélations en COSY et NOESY, qui permettent de reconstruire la molécule de proche en proche. Le proton anomérique est clairement identifiable à 5,11 ppm, avec un déplacement chimique du carbone caractéristique de 104,7 ppm. La constante de couplage de valeur élevée entre H1'' et H2'' (6,6 Hz) indique une position axiale sur le cycle pour chacun de ces deux protons, voisins d'après la multiplicité des signaux et la corrélation observée en COSY. L'indication concernant la position axiale du proton H3'' est également donnée par la grande constante de couplage des signaux observés pour H2'' et H3'' (8,4 Hz), H4'' étant donc de fait en position équatoriale ($J(\text{H3''} \rightarrow \text{H4''}) = 3,2 \text{ Hz}$). Les positions axiales et équatoriales des deux protons H5'' ne peuvent être déduites des signaux du spectre de RMN ^1H , les deux protons ayant des constantes de couplage du même ordre. Cependant, une corrélation en NOESY relevée entre le proton H1'' et le proton à 3,44 ppm indique que ce dernier est bien le proton H5'' *ax*, du même côté de la molécule que H1''. L'ensemble de la stéréochimie du sucre, identifié comme l' α -L-arabinopyranose suite à cette analyse et à la comparaison avec les données de la littérature (Mechikova *et al.*, 2008; Paradowska *et al.*, 2008; Prabu *et al.*, 2006; Stark *et al.*, 2005), a pu être confirmée par les corrélations observées en NOESY (Figure 40). L'identification de cette molécule a également été effectuée par comparaison du spectre de RMN du proton obtenu avec celui d'un standard commercial analysé au laboratoire.

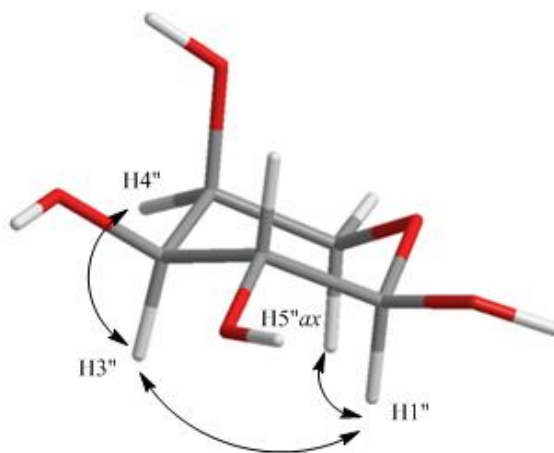


Figure 40 : Interactions NOE importantes pour déterminer la structure de l' α -L-arabinopyranose de la guaijaverine

Tableau 8 : Déplacements chimiques (δ) couplages homonucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY et NOESY) et hétéronucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) dans le CD_3OD pour la quercitine-3-*O*- α -L-arabinopyranoside (guaijaverine) (5)

Position	^1H : δ (ppm); multiplicité; J (Hz)	^{13}C : δ (ppm) d'après les analyses HSQC et HMBC ; mult.	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	COSY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)	NOESY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)
2		157,8 ; C			
3		135,1 ; C			
4		186,5 ; C			
5		158,6 ; C			
6	6,33 ; d ; $J = 2,0$ Hz ; 1H	95,4 ; CH	C5, C8, C4	H8	
7		? ; C			
8	6,15 ; d ; $J = 2,0$ Hz ; 1H	100,9 ; CH		H6	
9		? ; C			
10		? ; C			
1'		122,5 ; C			
2'	7,74 ; d ; $J = 2,2$ Hz ; 1H	117,0 ; CH	C1', C4', C2		
3'		145,8 ; C			
4'		149,9 ; C			
5'	6,86 ; d ; $J = 8,5$ Hz ; 1H	115,9 ; CH	C1', C3'	H6'	H6'
6'	7,58 ; dd ; $J = 8,5$; 2,2 Hz ; 1H	122,6 ; CH	C4'	H5'	H5'
1''	5,11 ; d ; $J = 6,6$ Hz ; 1H	104,7 ; CH	C3	H2''	H3'', H5'' <i>ax</i>
2''	3,90 ; dd ; $J = 8,4$; 6,6 Hz ; 1H	72,7 ; CH	C1'', C3''	H1'', H3''	
3''	3,64 ; dd ; $J = 8,4$; 3,2 Hz ; 1H	74,0 ; CH	C2''	H2''	H1'', H4''
4''	3,81 ; m ; 1H	68,9 ; CH		H5'' <i>ax</i>	H3''
5'' <i>ax</i>	3,44 ; dd ; $J = 12,4$; 3,0 Hz ; 1H	66,8 ; CH ₂		H4''	H1'', H5'' <i>eq</i>
5'' <i>eq</i>	3,82 ; dd ; $J = 12,4$; 2,9 Hz ; 1H		C1''		H5'' <i>ax</i>

Avicularine (6)

Les données des spectres de RMN sont indiquées dans le *Tableau 9*. La forme furanose de la quercitin-3- α -arabinoside est indiquée en particulier par l'isochromie des protons H5'' par comparaison avec des déplacements chimiques observés dans le cas de la guaijaverine, comme décrit par Vvedenskaya *et al.* (2004) pour ces deux molécules. Le proton anomérique est caractérisé par un déplacement chimique de 5,45 ppm. Sa constante de couplage n'est pas visible cependant. L'ordre de grandeur de cette constante doit cependant être faible, a priori de l'ordre de 1 Hz d'après les constantes de couplages observées pour H2'', ce qui serait cohérent avec le signal caractéristique décrit pour une configuration α de l'arabinofuranose (Torres-Mendoza *et al.*, 2006). La constante de couplage entre H2'' et H3'' ($J = 2,9$ Hz) indique un couplage *trans*, retrouvé également entre les protons H3'' et H4''. Les corrélations observées en COSY et en NOESY confirment les attributions et la stéréochimie de la molécule. Les déplacements chimiques obtenus pour les spectres de RMN du proton et du carbone sont cohérents par rapport à ceux décrits dans la littérature pour cette molécule (Lu et Yeap Foo, 1997; Mechikova *et al.*, 2008; Pistelli *et al.*, 1993; Vvedenskaya *et al.*, 2004) ou pour

le groupement arabinofuranoside (Correia *et al.*, 2008). L'identification de cette molécule a également été effectuée par comparaison du spectre de RMN du proton obtenu avec celui d'un standard commercial analysé au laboratoire.

Tableau 9 : Déplacements chimiques (δ) couplages homonucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY et NOESY) et hétéronucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) dans le CD_3OD pour la quercitrine-3- O - α -L-arabinofuranoside (avicularine) (6) ; $[\alpha]_D^{27} = -56$ (c 0,208 ; CH_3OH)

Position	^1H : δ (ppm); multiplicité; J (Hz)	^{13}C : δ (ppm) d'après les analyses HSQC et HMBC ; mult.	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	COSY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)	NOESY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)
2		158,7 ; C			
3		? ; C			
4		? ; C			
5		158,4 ; C			
6	6,34 ; d ; $J = 2,1$ Hz ; 1H	94,5 ; CH	C8, C10, C5	H8	
7		162,8 ; C			
8	6,17 ; d ; $J = 2,1$ Hz ; 1H	99,7 ; CH	C6, C10, C7, C9	H6	
9		167,5 ; C			
10		104,6 ; C			
1'		122,8 ; C			
2'	7,52 ; d ; $J = 2,0$ Hz ; 1H	116,5 ; CH	C6', C3', C4', C2		
3'		146,2 ; C			
4'		149,7 ; C			
5'	6,89 ; d ; $J = 8,4$ Hz ; 1H	116,1 ; CH	C1', C3', C4'	H6'	H6'
6'	7,48 ; dd ; $J = 8,4$; 2,0 Hz ; 1H	122,6 ; CH	C2', C4', C2	H5'	H5'
1''	5,45 ; brs ; 1H	109,3 ; CH	C4''	H2''	H2''
2''	4,32 ; dd ; $J = 2,9$; 1,0 Hz ; 1H	83,0 ; CH	C3''	H1'', H3''	H1'', H3''
3''	3,91 ; dd ; $J = 5,2$; 2,9 Hz ; 1H	78,4 ; CH		H2''	H2'', H5'' ^b
4''	3,87 ; brq ; $J = 4,5$ Hz ; 1H	87,7 ; CH	C3''	H5'' ^b	
5'' ^a	3,49 ; m ; 1H	62,2 ; CH ₂			H3''
5'' ^b	3,48 ; dd ; $J = 12,0$; 4,6 Hz ; 1H		C3''	H4''	

Quercitrine (7)

Cette molécule (données de RMN dans le *Tableau 10*) se caractérise encore une fois par un squelette quercitrine aisément identifiable et par un proton anomérique à 5,34 ppm de constante de couplage de 1,7 Hz, indiquant la configuration α du sucre associé. Celui-ci se distingue des glycosides précédemment décrits du fait de la présence d'un signal associé à un déplacement chimique de 0,94 ppm pour le proton et 17,4 ppm pour la RMN du carbone, signe de la présence d'un groupement méthyle sur la partie sucrée. L'attribution des différents signaux et l'identification de la stéréochimie du sucre peuvent comme précédemment être effectuées par l'analyse des constantes de couplage et des corrélations observées en COSY. La constante de couplage de 9,4 Hz relevée dans le signal de H3''

(couplage avec H4'') indique que ce proton est en position axiale. De fait H2'' se trouve donc en position équatoriale ($J = 3,4$ Hz). Une unique corrélation est observée en NOESY entre H3'' et H2''. (Figure 41). L'identification de cette molécule a également été effectuée par comparaison du spectre de RMN du proton obtenu avec celui d'un standard commercial analysé au laboratoire.

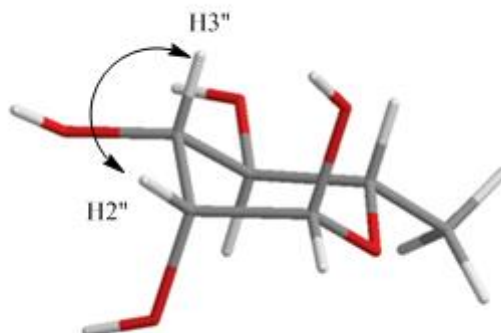


Figure 41 : Interaction NOE visible pour la détermination de la structure de l' α -L-rhamnopyranose de la quercitrine

Tableau 10 : Déplacements chimiques (δ) couplages homonucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$ (COSY et NOESY) et hétéronucléaires $^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$ (HMBC) dans le CD_3OD pour la quercitrine-3-O- α -L-rhamnopyranoside (quercitrine) (7)

Position	^1H : δ (ppm); multiplicité; J (Hz)	^{13}C : δ (ppm) d'après les analyses HSQC et HMBC ; mult.	HMBC ($^1\text{H} \rightarrow ^{13}\text{C}$)	COSY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)	NOESY ($^1\text{H} \rightarrow ^1\text{H}$)
2		? ; C			
3		? ; C			
4		? ; C			
5		? ; C			
6	6,31 ; d ; $J = 2,1$ Hz ; 1H	95,1 ; CH		H8	
7		? ; C			
8	6,15 ; d ; $J = 2,1$ Hz ; 1H	100,5 ; CH		H6	
9		? ; C			
10		? ; C			
1'		122,8 ; CH			
2'	7,33 ; d ; $J = 2,1$ Hz ; 1H	116,6 ; CH	C4'		
3'		? ; C			
4'		149,4 ; CH			
5'	6,90 ; d ; $J = 8,2$ Hz ; 1H	116,1 ; CH	C1''	H6'	H6'
6'	7,30 ; dd ; $J = 8,2 ; 2,1$ Hz ; 1H	122,5 ; CH		H5'	H5'
1''	5,34 ; d ; $J = 1,7$ Hz ; 1H	103,4 ; CH	C3''	H2''	
2''	4,21 ; dd ; $J = 3,4 ; 1,7$ Hz ; 1H	71,8 ; CH		H1'', H3''	H3''
3''	3,74 ; dd ; $J = 9,4 ; 3,4$ Hz ; 1H	71,8 ; CH		H2'', H4''	H2''
4''	3,34 ; m ; 1H	72,7 ; CH		H3''	
5''	3,42 ; m ; 1H	? ; CH		H6''	
6''	0,94 ; d ; $J = 6,1$ Hz ; 3H	17,4 ; CH ₃	C4''	H5''	

Evaluation de l'activité antiplasmodiale des molécules isolées et des fractions

Les résultats obtenus pour les molécules pures isolées sont les suivants (Tableau 11):

Tableau 11 : Mesure de l'activité antiplasmodiale et de la cytotoxicité des molécules pures isolées de l'extrait à l'acétate d'éthyle de *Psidium acutangulum* (n.i. : non identifié)

N°	Molécule	CI ₅₀ <i>P. falciparum</i> FcB1 (µg/ml)	CI ₅₀ <i>P. falciparum</i> FcB1 (µM)	ED ₅₀ VERO (µg/ml)
(1)	Catéchine	21,0	72,3	n.t.
(2)	n.i.	19,5	-	> 100
(3)	Quercitrine-3-O-β-D-xylofuranoside	2,4	5,5	> 100
(4)	Reynoutrine	11,5	26,5	> 100
(5)	Guaijaverine	3,0	6,9	> 100
(6)	Avicularine	28,0	64,5	> 100
(7)	Quercitrine	32,0	71,4	> 100
(8)	n.i.	3,5	-	> 100
	Chloroquine	0,06	0,18	-

Les résultats obtenus mettent en évidence trois molécules présentant une activité antiplasmodiale modérée : la quercitrine-3-O-β-D-xylofuranoside, jamais décrite à ce jour dans la littérature à notre connaissance, la guaijaverine et la molécule (8) non encore identifiée, mais donc les données de RMN indiquent cependant qu'il s'agit encore une fois d'un flavonoïde glycosylé. Ces trois molécules possèdent une CI₅₀ de l'ordre de 2 à 3 µg/ml (5,5 µM et 6,9 µM respectivement pour la molécule (3) et la guaijaverine). Aucune des molécules isolées ne présente de cytotoxicité (ED₅₀ > 100 µg/ml) sur la lignée cellulaire testée.

D'après les données de la littérature, de toutes les molécules isolées précédemment, seule la quercitrine possède une activité antiplasmodiale connue sur *Plasmodium falciparum*, avec une CI₅₀ mesurée de 4,1 µg/ml (9,1 µM) sur souche chloroquino-sensible CDC1 (Liu *et al.*, 2007) et une inhibition de la prolifération du parasite de 34 % sur souche FCR3 cycloguanil-résistante de Gambie pour une concentration en quercitrine de 0,05 ng/ml (Murakami *et al.*, 2001). Dans le cas de notre étude cependant, cette molécule n'est pas considérée comme active (CI₅₀ > 10 µg/ml). Aucune donnée n'a été trouvée dans la littérature concernant une éventuelle activité antimalarique de la reynoutrine, de la guaijaverine ou de l'avicularine.

Afin d'avoir un suivi plus exhaustif de l'activité antiplasmodiale de l'extrait, les fractions intermédiaires récupérées entre les molécules pures ont également été évaluées sur *P. falciparum* FcB1 (Tableau 12).

Tableau 12 : Activités antiplasmodiales des fractions intermédiaires de l'extrait à l'acétate d'éthyle de de *P. acutangulum*

Référence	CI ₅₀ <i>P. falciparum</i> FcB1 (µg/ml)
BC	32
G	3,5
HIJ	3,8
K	3,2
L	3,25
N	3,3

Ainsi la fraction BC, isolée entre la catéchine et la molécule (2), toutes deux inactives, ne présente pas non plus d'activité. Les fractions G et HIJ contiennent en particulier les molécules séparées grâce à un fractionnement supplémentaires ayant abouti à l'isolement des produits (4) à (7). Il est donc logique de mesurer pour ces fractions une activité modérée. La fraction K est constituée d'un mélange de molécules non identifiées et non isolées, dont l'étude pourrait donc s'avérer intéressante – même si au vu de la CI₅₀ de cette fraction les activités des molécules qui en seraient éventuellement isolées seraient sans doute également modérées. Enfin, les fractions L et N contiennent de façon majoritaire la molécule (8), qui présente une activité modérée et peut donc expliquer la valeur relevée pour ces deux mélanges. Les molécules isolées donnent donc une image relativement complète de l'activité de l'extrait à l'acétate d'éthyle.

Afin d'avoir une meilleure visibilité du rôle de chaque molécule ou fraction dans l'activité de cet extrait, la concentration de chaque molécule ou mélange dans la décoction a été calculée à partir des masses de produits isolées après fractionnement et en prenant en compte le rendement d'extraction (Tableau 13). Pour mieux visualiser la contribution de chacun des produits, l'effet inhibiteur (EI), décrivant la contribution de chaque molécule ou fraction en fonction de sa concentration, a été calculé comme décrit par Deharo et Ginsburg, par la formule :

$$EI = 100 - \frac{100}{1 + x/CI(50)}$$

Avec x la concentration (calculée à partir du rendement d'extraction du composé) à la CI₅₀ de l'extrait (c'est-à-dire le rendement d'extraction multiplié par la CI₅₀ de l'extrait brut, prise ici à 1 µg/ml) et CI₅₀ la mesure de l'activité antiplasmodiale de ce composé (Deharo et Ginsburg, 2011). Le calcul a également été appliqué ici aux fractions intermédiaires. La contribution de chaque composé est ensuite mesurée en pourcentages.

Tableau 13 : Concentration et activité antipaludique des constituants de la décoction de tiges de *P. acutangulum*

Référence	Nom	Concentration dans la tisane (mg/ml)	Cl ₅₀ <i>P. falciparum</i> FcB1 (µg/ml)	Rendement / PSIF (%)	Effet inhibiteur	Contribution du composé à l'activité de l'extrait (%)
(1)	Catéchine	0,22	21,0	9,1	0,43	0,86
BC	Mélange	0,09	32,0	3,7	0,12	0,23
(2)	n.i.	0,15	19,5	6,2	0,32	0,63
(3)	Quercitine-3-O-β-D-xylofuranoside	0,22	2,4	9,1	3,65	7,31
G	Mélange	0,10	3,5	4,0	1,13	2,26
(4)	Reynoutrine	0,15	11,5	1,8	0,16	0,31
(5)	Guaijaverine	0,06	3,0	0,7	0,23	0,47
(6)	Avicularine	0,12	28,0	1,5	0,05	0,11
(7)	Quercitrine	0,06	32,0	0,7	0,02	0,04
K	Mélange	0,15	3,2	6,2	1,90	3,80
L	Mélange	0,08	3,3	3,5	1,07	2,13
(8)	n.i.	0,13	3,5	5,5	1,55	3,09
N	Mélange	0,08	3,3	3,5	1,05	2,10

Il apparaît ainsi que l'activité de l'extrait et de la décoction sont dues au mélange des molécules, et non à une molécule en particulier, comme dans le cas des préparations à base de feuilles de *Q. amara*. Les molécules (3) et (8), ainsi que le mélange K, sont les principaux contributeurs à l'activité antiplasmodiale du mélange. L'activité des molécules pures isolées ici ne semble cependant expliquer la totalité de l'activité antiplasmodiale de l'extrait à l'acétate d'éthyle de *Psidium acutangulum* (Cl₅₀ < 1 µg/ml) mais seul un dosage précis de la concentration des molécules dans l'extrait total permettrait de conclure à ce sujet.

Le fait que les Cl₅₀ de chacune des molécules isolées soient inférieures à la valeur de Cl₅₀ relevée pour l'extrait total est un phénomène courant dans le domaine des substances naturelles. Ceci peut être de façon générale dû soit à la perte de produits lors du fractionnement, les molécules les plus actives n'ayant finalement pas été isolées, soit à une dégradation de certains produits lors des étapes de séparation, les composés pouvant être plus fragiles une fois isolés qu'en mélange, ou soit enfin à des phénomènes de synergie entre les différents constituants de l'extrait ou de la préparation (Houghton *et al.*, 2007). Ces divers aspects peuvent être illustrés par l'exemple de la valériane (*Valeriana officinalis* L., Caprifoliaceae), plante pour laquelle les propriétés sédatives ne sont actuellement pas totalement expliquées du fait des molécules isolées (acide valérinique, valéranone...). Il a été suggéré que l'activité pourrait provenir de produits de dégradation de ces molécules, mais le fait de savoir si l'activité des extraits est liée à un seul composé, à plusieurs composés inconnus ou à des phénomènes de synergie reste à ce jour inexpliqué (Gurib-Fakim,

2006). Ces effets de synergie sont en effet de plus en plus soulignés dans le cadre de l'étude des substances naturelles. De nombreux exemple *in vitro* (*Ginkgo biloba*, *Cannabis sativa* (Cannabaceae), huiles essentielles...) et cliniques (écorce de saule (*Salix alba* L., Salicaceae), millepertuis (*Hypericum* sp.)...) sont en particulier cités dans une revue récente (Williamson, 2001). Le calcul de la contribution de chaque constituant à l'activité de l'extrait permet ici de supposer que soit le composé actif n'a pas été isolé, et n'est pas non plus présent dans les fractions intermédiaires, soit il existe effectivement un fort effet de synergie entre ces molécules, la contribution de la molécule la plus active n'expliquant que 7 % de l'activité totale de l'extrait. Encore une fois cependant, un dosage précis de la concentration de chacune des molécules serait nécessaire pour conclure de façon certaine.

L'activité antipaludique des flavonoïdes, et en particulier des flavonols glycosylés dont les dérivés de la quercitrine, a déjà été mise en évidence dans le cadre de plusieurs travaux, comme dans le cas de la 5-galloylquercitrine-3-*O*- α -L-arabinofuranoside isolée de *Calycolpus warszewiczianus* O. Berg (Myrtaceae), avec une CI_{50} mesurée sur une souche chloroquino-résistante (W2) de *P. falciparum* de 14,5 μ M (Torres-Mendoza *et al.*, 2006). Comme dans le cas de notre étude, aucune cytotoxicité de ce composé et des autres arabinosides de flavonol, dérivés de la myricétine, sur cellules VERO n'a été relevée. Dans le cadre des travaux de Liu *et al.* et Murakami *et al.* cités plus haut, des études de relations structure – activité ont été menées sur les flavonols glycosylés. Il a ainsi été mis en évidence que les diglycosides de flavonols présentent une activité antiplasmodiale modérée, tout comme les monoglycosides de flavonols, alors que les flavonols non glycosylés (quercitrine et kaempférol) ne montrent aucune activité. Aucune relation claire entre l'activité et la concentration n'a cependant pu être mise en évidence dans ce cas de figure (Murakami *et al.*, 2001). D'autres types de flavonoïdes (citflavanone, lonchocarpol A et 8-prényldaïdzéine), non glycosylés, ont dans le cadre d'une évaluation sur la souche K1 de *P. falciparum* été caractérisés par des $CI_{50} \leq 5$ μ g/ml (Khaomek *et al.*, 2008). Le mode d'action de la quercitrine a également été étudié, et il a été démontré (Liu *et al.*, 2007) que cette molécule interrompt le cycle érythrocytaire du parasite lors de la transition entre le stade trophozoïte et le stade schizonte. Il a également été mis en évidence par les mêmes auteurs que la quercitrine inhibe 100 % de la croissance du parasite à une dose de 10 μ g/ml (22 mM) (souche CDC1 chloroquino-sensible), ce qui n'est pas le cas dans les essais biologiques réalisés dans notre étude pour cette molécule (souche FcB1 chloroquino-résistante).

3. Conclusion de l'étude de préparations phytothérapeutiques à base de rameaux de *Psidium acutangulum* DC.

Cette étude a permis de mettre en évidence l'existence de plusieurs molécules antipaludiques dans la décoction de rameaux de *P. acutangulum* utilisée par les Amérindiens Wayana du Haut-Maroni (*Figure 42*) en Guyane française en cas d'accès palustre. L'importance de la saison de récolte du matériel végétal – et donc de l'état de maturation de la plante – pour l'évaluation de l'activité biologique *in vitro* du remède a également été soulignée. L'état de dessiccation de la plante n'a pas semblé ici présenter d'effet notable sur l'activité antiplasmodiale *in vitro*.

Les molécules isolées et identifiées sont des flavonols glycosylés, famille dont ont déjà été isolés des composés inhibant la croissance de *P. falciparum in vitro*. Dans le cadre de la recherche de nouvelles substances antipaludiques, les flavonoïdes et leurs analogues sont considérés comme des sources potentielles de composés d'intérêt. Ce type de molécule a par exemple été utilisé afin de générer un modèle de pharmacophore pour la recherche de molécules inhibant la biosynthèse des acides gras chez le parasite (Gupta *et al.*, 2010).

Les molécules isolées présentent une activité antipaludique modérée (CI₅₀ allant de 2,4 à 3,5 µg/ml, soit des valeurs de 5,5 µM pour la quercitine-3-*O*-β-D-xylofuranoside, composé nouvellement isolé, et 6,9 µM pour la guaijaverine, dont l'activité antiplasmodiale n'avait jamais été décrite. Cependant, la non-toxicité de ces molécules comme de l'extrait brut fait de ce remède une préparation présentant un certain potentiel en vue du développement d'un traitement contre le paludisme. Contrairement à *Q. amara*, espèce pour laquelle l'activité de l'infusion de feuille n'était due qu'à une seule molécule, la simalikalactone D, l'activité de la décoction est due ici au mélange des molécules. L'absence de toxicité et les valeurs d'activité relevées indiquent que ce remède serait intéressant à étudier dans l'optique de la mise au point d'un médicament phytothérapeutique à partir de la totalité de la décoction de rameaux, plutôt que dans la recherche de nouvelles têtes de série. Il est bien sûr trop tôt au vu de l'étude réalisée pour conclure à la validation de ce remède traditionnel, les tests effectués ne l'ayant été qu'*in vitro*. Lors du passage à l'*in vivo*, la possibilité que certains composés soient métabolisés, et que les phénomènes de pharmacocinétique interviennent également, n'est pas négligeable (Gertsch, 2009). Une étude poussée de la décoction *in vivo* serait donc d'un grand intérêt dans ce cas de figure.

Enfin, il est souligné dans la littérature qu'il est parfois regrettable qu'un extrait évalué suite à une indication antipaludique ne le soit que vis-à-vis de l'inhibition de la croissance de *P. falciparum*, et non en sus de cette étude pour ses éventuels effets anti-inflammatoires ou antipyrétiques, activités pouvant aider à la réduction des symptômes en cas d'accès palustre (Houghton *et al.*, 2007). Ce type d'activités ayant été mis en évidence pour un extrait de feuilles de *P. guajava* (Olajide *et al.*, 1999),

des essais pourraient d'avérer pertinents dans le cas de la décoction de *P. acutangulum* ou de son extrait à l'acétate d'éthyle.



Figure 42 : Tukusipan (carbet communautaire) du village de Taluhwen, Haut-Maroni (photographie P. Lecomte, 2005)

Chapitre 2 : Conclusion

L'étude de deux remèdes traditionnels de Guyane française recommandés pour le traitement du paludisme a pu mettre en évidence deux modes d'action différents : dans le cas de *Q. amara*, une unique molécule, la simalikalactone D, est responsable de l'activité (et de la toxicité) de l'infusion de jeunes feuilles fraîches, et dans le cas de la décoction de *P. acutangulum*, c'est un mélange de molécules modérément actives qui a été mis en lumière, avec potentiellement des effets de synergie entre les différents constituants de l'extrait. D'un côté, la mise en évidence de l'activité de la simalikalactone D pourrait permettre de relancer les débats sur l'intérêt des quassinoïdes dans la recherche de nouvelles molécules antipaludiques, et ouvrir des voies sur les potentialités de ce composé en termes de combinaison avec d'autres médicaments, permettant ainsi de limiter les doses utilisées, et donc de réduire la toxicité. D'autre part, le fait que l'activité de la décoction de *P. acutangulum* soit due à un mélange de molécules oriente plutôt la poursuite des études concernant ce remède vers la voie des médicaments phytothérapeutiques. L'extrait total, riche en flavonols glycosylés, pourrait également être utilisé en combinaison avec les antipaludiques du marché, s'inspirant ainsi de l'exemple de l'artémisinine, dont l'activité est augmentée par divers flavonoïdes présents dans la plante d'où elle est issue (Bilia *et al.*, 2006), ou de la mise en évidence de la potentialisation *in vivo* de cette molécule par un extrait de racine d'*Eurycoma longifolia* Jack, contenant en particulier des flavonoïdes (Mohd Ridzuan *et al.*, 2007; Sriwilaijaroen *et al.*, 2010). Un des avantages majeur de cette préparation et de ses constituants est qu'ils ne présentent aucune toxicité sur les cellules VERO testées.

Ces deux études ne permettent pas de valider l'usage des remèdes étudiés, mais donnent des éléments en vue de recommandations de ce type. Dans le cas de la tisane de feuilles de *Q. amara*, une étude clinique sur la molécule active, la simalikalactone D, devrait être menée comme cela a déjà été fait sur un analogue de ce composé, la brucéantine, avant toute recommandation d'usage. Dans le cas de la décoction de *P. acutangulum*, si l'écueil de la toxicité semble ici contourné, des études *in vivo* devraient être réalisées sur la décoction et son extrait afin de mieux identifier leurs activités. Ainsi, la plus grande attention doit être portée aux conclusions émises suite à des études menées sur la base d'enquêtes ethnopharmacologiques, car celles-ci peuvent rapidement avoir un impact sur la société, en particulier quand des recommandations d'usage sont effectuées. La publication de données en ethnopharmacologie n'est donc pas seulement une question scientifique, mais aussi éthique.

Quoi qu'il en soit, dans le cadre des essais réalisés ici, il est inutile d'ajouter un crabe aux préparations étudiées !

Chapitre 3 : La « *Quinte Essence* » amazonienne contre les mycoses

*Etude chimique et mise en évidence des propriétés antifongiques de
l'huile essentielle d'Otacanthus azureus (Linden) Ronse
(Plantaginaceae)*

*Criblage et étude métabolomique d'huiles essentielles à activité
antifongique*

A. Terpènes et huiles essentielles

Les huiles essentielles (*Figure 43*) sont composées de molécules volatiles odorantes, majoritairement issues de la famille des terpénoïdes, et qui s'accumulent dans des glandes et tissus spécialisés des végétaux : cellules épidermiques des pétales chez les Rosaceae ou les Oleaceae, glandes épidermiques des Labiaceae, poches sécrétrices des Rutaceae ou canaux sécréteurs des Apiaceae (anciennement Umbelliferae) (Gilly, 1997). Le fait que les huiles soient produites dans des cellules spécialisées permet à la fois de réduire le risque d'autotoxicité pour la plante et de stocker des quantités importantes de métabolites secondaires à l'endroit où ils seront le plus utiles pour leur rôle de défense ou d'attraction (Figueiredo *et al.*, 2008). Ces huiles sont obtenues par entraînement à la vapeur ou hydrodistillation pour 93 % d'entre elles, ainsi que par d'autres techniques comme l'expression à froid (dans le cas des zestes d'agrumes par exemple) (Masango, 2005). Depuis quelques années, de nouveaux produits, les huiles volatiles, sont également obtenus par extraction aux fluides – en particulier le CO₂ – supercritiques (Damjanovic *et al.*, 2005; Pourmortazavi et Hajimirsadeghi, 2007).



Figure 43 : Huiles essentielles obtenues au laboratoire de chimie à Cayenne

Actuellement, près de 3 000 huiles essentielles sont décrites, parmi lesquelles environ 300 présentent une importance commerciale dans le cadre d'applications pharmaceutiques, cosmétiques, alimentaires, agronomiques ou dans le domaine de la parfumerie (Bakkali *et al.*, 2008; Dorman et Deans, 2000; Hammer *et al.*, 1999; Mishra et Dubey, 1994; Tajkarimi *et al.*, 2010).

Dans le domaine de la cosmétique, ces huiles sont utilisées afin de donner une odeur agréable au produit – masquage de l'odeur des principes actifs, meilleure régularité dans l'utilisation du produit du fait de la sensation agréable apportée, odeur unique des cosmétiques développés – mais aussi comme conservateurs, du fait des propriétés antimicrobiennes – c'est-à-dire antifongiques et antibactériennes – fréquemment rencontrées pour les huiles essentielles (Buchbauer, 2000). Dans le domaine de la parfumerie, même si les produits naturels ont pu connaître un déclin lors de l'essor de la chimie de synthèse, les huiles essentielles jouent toujours un rôle fondamental. Le bois de rose

de Guyane française (*Aniba rosaeodora* Ducke, Lauraceae) en est un bon exemple : largement exploité au début du XXe siècle – les premières distilleries ouvrirent en 1900, la plus importante appartenant à Roure-Bertrand-Fils, une famille de parfumeurs grasseois – son exploitation fut stoppée dans les années 1970 du fait de la raréfaction d'une ressource naturelle mal gérée mais aussi du remplacement de l'huile essentielle dans la formulation des parfums par du linalol de synthèse (Bruleaux, 1990). L'huile essentielle de bois de rose, composée en très grande majorité de linalol – de 70 à 90 % pour les huiles trouvées habituellement dans le commerce (Santana *et al.*, 1997) – possède cependant une plus grande richesse olfactive que la molécule pure, du fait de la présence des constituants minoritaires, le chemotype recherché étant celui le plus riche possible en linalol levogyre (Chantraine *et al.*, 2009). De fait, la demande auprès des parfumeurs, même moins importante, reste constante (Vial-Debas, 1996). L'huile essentielle de bois de rose, à l'odeur florale, légèrement boisée, rosée, poivrée, est utilisée principalement en parfumerie fine de luxe, par exemple pour la formulation de Jicky de Guerlain dès 1889 ou de Parfum sacré de Caron (1991)¹². Le bois de rose de Guyane française ayant en particulier une excellente réputation dans le domaine de la parfumerie, la production de l'huile essentielle en a été relancée à petite échelle par une entreprise locale, Sylvestence, et une étude (projet Anib@rosa, PO FEDER) portant sur les conditions optimales pour la production d'huile essentielle (climat, sol et terrain génétique) et le développement d'un outil de traçabilité permettant de certifier l'origine de la graine est actuellement en cours. Cette approche permettra de lever les verrous réglementaires liés à l'inscription du bois de rose sur la liste des espèces protégées, mais également de remettre cette ressource au cœur de l'histoire et de l'économie de la Guyane.

Les applications thérapeutiques sont dues en particulier au fait que certaines de ces huiles possèdent des activités intéressantes, par exemple l'action antimicrobienne de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* Cheel (Myrtaceae) (Carson et Riley, 2003). La diversité des mécanismes d'action impliqués dans les activités de ces produits permettrait en particulier de limiter le taux de développement des résistances. Les huiles essentielles semblent en effet ne pas avoir de cibles cellulaires spécifiques, du fait de leur grand nombre de constituants. Elles peuvent par exemple avoir une action antimicrobienne par lyse de la cellule entière du fait de l'endommagement de la membrane, altérer la perméabilité de la membrane cellulaire et de ce fait mettre en cause les capacités de régulation osmotique de la cellule ou d'exclusion des composés toxiques, et empêcher la respiration cellulaire des mitochondries, comme mis en évidence dans le cas de l' α -pinène sur des levures (Carson *et al.*, 2002). D'autres mécanismes comme des perturbations des voies de biosynthèse ou des systèmes enzymatiques peuvent également être impliqués (Tajkarimi *et al.*, 2010). Ces actions sont dues aux constituants lipophiles des huiles essentielles, pouvant donc traverser facilement les

¹² <http://www.osmoz.fr/Encyclopedia/Matieres-premieres/Bois/Bois-de-Rose-Aniba-Rosaeodora>, consulté le 02/02/2011

membranes cellulaires et en bouleverser la structure et le fonctionnement (Bakkali *et al.*, 2008). De plus, certains facteurs tels que la stéréochimie des molécules impliquées, leur lipophilie, les groupements fonctionnels qui les caractérisent ou leur degré de solubilité en milieu aqueux influencent l'activité antifongique et antibactérienne des huiles essentielles (Dorman et Deans, 2000; Tajkarimi *et al.*, 2010). Il a ainsi été montré que les isomères α et *cis* des terpènes constituant les huiles essentielles sont plutôt inactifs relativement aux isomères β et *trans*, et que la présence de fonctions oxygénées (groupement hydroxyle des composés phénoliques, groupement acétate, fonction aldéhyde conjuguée avec une double liaison carbone-carbone...) accroît les propriétés antimicrobiennes des terpénoïdes (Dorman et Deans, 2000).

De façon générale, les terpénoïdes jouent un rôle fondamental dans les interactions entre organismes vivants, permettant par exemple à une plante d'attirer les pollinisateurs, ou les prédateurs ou parasitoïdes des herbivores venant l'attaquer (Gershenzon et Dudareva, 2007; Pichersky et Gershenzon, 2002; Unsicker *et al.*, 2009), et participent au système de défense antimicrobien des plantes (Tajkarimi *et al.*, 2010). C'est en particulier ce dernier rôle qui donne toute sa cohérence à une stratégie bioinspirée de recherche de composés antifongiques et antibactériens parmi les métabolites secondaires, et en particulier les huiles essentielles (Figueiredo *et al.*, 2008).

B. Les pathologies fongiques humaines

1. Infections fongiques : causes et description

Les champignons, organismes saprophytes et ubiquitaires, se classent généralement en deux catégories : les levures et les champignons filamenteux. Les infections fongiques chez l'homme, causées par l'une ou l'autre de ces deux classes, sont décrites sous le nom de mycoses (Ratnajara, 2006). Celles-ci peuvent être de plusieurs types : superficielles (peau, cheveux, ongles), sous-cutanées ou systémiques (Hay, 2006; Lupi *et al.*, 2005).

Les mycoses superficielles sont le plus souvent causées par des champignons filamenteux, dits dermatophytes, et incluant en particulier les genres anamorphiques de champignons asexués (ou imparfaits) *Trichophyton*, *Microsporum* et *Epidermophyton* (Ratnajara, 2006; Weitzman et Summerbell, 1995). Ces infections sont généralement connues sous le nom de teignes, les espèces du genre *Trichophyton* (*T. rubrum*, *T. mentagrophytes*) étant par exemple responsable du très répandu « pied d'athlète » (Venkatesan *et al.*, 2005; Weitzman et Summerbell, 1995). Ces champignons infectent l'organisme en dégradant la kératine des tissus humains et animaux (Weitzman et Summerbell, 1995).

Les levures du genre *Candida* sont également responsables d'un grand nombre de mycoses superficielles, le pathogène le plus répandu étant *C. albicans*, causant par exemple le muguet du nourrisson. Ces mycoses superficielles touchent généralement toutes les catégories de population (Hay, 2006; Ratnajara, 2006). Elles sont répandues dans le monde entier, certaines d'entre elles étant cependant plus présentes dans les zones tropicales du fait de facteurs climatiques (chaleur et humidité favorables au développement des mycoses) ou sociaux (question de l'accès aux soins) (Hay, 2006). Les infections à *Malassezia* spp. (hyper- ou hypo-pigmentation de la peau) sont en particuliers plutôt limitées aux tropiques, l'exposition au soleil pouvant être un facteur déclenchant (Ratnajara, 2006).

Les mycoses sous-cutanées sont quant à elles majoritairement présentes dans les zones tropicales et sub-tropicales. Il s'agit d'infections dues à une contamination du derme et des tissus sous-cutanés par des pathogènes généralement originaires de l'environnement extérieur (sol, plantes...). Elles peuvent éventuellement s'étendre à l'épiderme et regroupent en particulier les mycoses du type sporotrichoses, mycétomes ou chromoblastomycoses (Hay, 2006; Lupi *et al.*, 2005). Le concept de biofilm dans le cas des champignons dermatophytes a également été introduit afin d'expliquer en particulier certains cas d'onychomycoses résistantes aux traitements classiques et nécessitant une intervention chirurgicale (Martinez-Rossi et Peres, 2008).

Les mycoses systémiques opportunistes touchent plus particulièrement les patients gravement malades (VIH en particulier) ou immunodéprimés. Elles sont en particulier causées par les levures du genre *Candida*, présentes à l'état normal dans la flore microbienne de la peau, des muqueuses, de l'appareil digestif et du système reproducteur humain (Galvan et Mariscal, 2006). La virulence de ces souches s'explique par leur grande capacité d'adaptation à des habitats divers, ainsi que par la possibilité pour les cellules de ces levures de s'associer pour former des biofilms – de façon plus ou moins efficace selon les espèces et les souches – qui adhèrent aux surfaces et sont responsables des mycoses (Miceli *et al.*, 2011).

C. albicans est l'espèce majoritairement à l'origine de ces infections, mais *C. glabrata* – second agent responsable des candidémies aux Etats-Unis – *C. tropicalis* et *C. parapsilosis* – espèces les plus fréquentes après *C. albicans* en Amérique latine – et dans une moindre mesure *C. krusei* sont également rencontrés (Nucci et Marr, 2005; Ratnajara, 2006; Warnock, 2007). *C. parapsilosis* infecte préférentiellement les patients de soins intensifs et les nouveau-nés, alors que *C. krusei* et *C. tropicalis* seront plutôt rencontrés dans le cas des patients subissant des greffes de moelle ou de cellules-souches (Miceli *et al.*, 2011). Actuellement, plus de 50 % des infections systémiques causées par des *Candida* le sont par des espèces non-*albicans* (Miceli *et al.*, 2011; Nucci et Marr, 2005). Ces infections peuvent par exemple être endogènes, causées par des traitements lourds aux antibiotiques déséquilibrant la flore intestinale et permettant la prolifération des pathogènes, mais aussi par des

contaminations exogènes dues à la colonisation par les micro-organismes des dispositifs médicaux (cathéters, dispositifs intravasculaires, sondes urinaires...) (Galvan et Mariscal, 2006). Elles peuvent conduire à des complications telles que les endocardites, des obstructions de la veine cave ou des thromboses veineuses, et peuvent également atteindre les yeux, le système nerveux central ou les poumons (Ratnajara, 2006). D'autres infections systémiques peuvent par exemple être causées par des levures (*Cryptococcus* sp., *Trichosporon* sp.) ou des champignons filamenteux (*Aspergillus* sp.) (Miceli *et al.*, 2011; Ratnajara, 2006; Venkatesan *et al.*, 2005; Warnock, 2007). Ces infections opportunistes sont présentes partout dans le monde, mais certains types d'infections systémiques, dites endémiques, existent également de façon spécifique dans les zones tropicales (infections respiratoires) (Hay, 2006).

L'incidence des infections fongiques, quelle que soit leur catégorie, est en nette croissance ces dernières années du fait de l'augmentation du nombre de patients à haut risque et du développement des résistances aux antifongiques actuels (Georgopapadakou et Walsh, 1996; Ratnajara, 2006). En effet, les progrès thérapeutiques et chirurgicaux ont permis des avancées notables dans le domaine des greffes, du traitement des maladies chroniques comme le diabète, des traitements contre le VIH, des opérations chirurgicales lourdes ou des soins aux enfants grands prématurés. Ces patients sont cependant beaucoup plus sensibles aux mycoses du fait de l'altération de leurs défenses immunitaires (Galvan et Mariscal, 2006; Warnock, 2007). Une étude menée entre 1980 et 1990 aux Etats-Unis par le NNIS (National Nosocomial Infections Surveillance System) avait à l'époque déjà mis en évidence une augmentation du nombre d'infections fongiques chez les patients des hôpitaux américains, le nombre de cas étant passé en une décennie de 2,0 à 3,8 pour 1 000 patients à la fin de leur période d'hospitalisation (Beck-Sagué *et al.*, 1993).

2. Traitements actuels et problématiques rencontrées

Traitements

Les champignons sont des organismes eukaryotes dont la membrane plasmique est constituée en grande majorité d'ergostérol, un analogue du cholestérol (Martinez-Rossi et Peres, 2008) – molécule remplissant cette fonction chez les mammifères – synthétisé à partir du squalène dans un premier temps, puis du lanostérol dans une seconde étape. La plupart des antifongiques actuels agissent donc, à un stade ou à un autre de la voie de biosynthèse, sur cette molécule (Elewski, 1998; White *et al.*, 1998). Des classes de composés ayant des mécanismes d'action différents ont cependant été développées récemment, en particulier les échinocandines. Cinq types de traitements sont présentés ci-dessous (*Figure 44*).

Polyènes

Parmi les traitements les plus répandus contre les mycoses figure toujours l'amphotéricine B, découverte en 1956, qui présente cependant une toxicité non négligeable (Georgopapadakou et Walsh, 1996; White *et al.*, 1998). Cette molécule, de la classe des polyènes tout comme la nystatine, a été au départ isolée d'une souche de *Streptomyces* d'un échantillon de sol. Lipophile, elle est efficace aussi bien vis-à-vis des levures que des champignons filamenteux, se liant aux stérols tels que l'ergostérol, augmentant ainsi la perméabilité de la membrane, conduisant à la perte du contenu cytoplasmique et à la mort de la cellule (Georgopapadakou et Walsh, 1996; Jamieson, 2006). Sa toxicité provient en conséquence de ce mécanisme d'action non spécifique sur la membrane cellulaire (Jamieson, 2006). Des formulations lipidiques (dispersion colloïdale, liposomes...) développées ces dernières années permettent de diminuer en particulier la toxicité néphrologique, et donc d'administrer des doses de médicament plus importantes (Jamieson, 2006; Venkatesan *et al.*, 2005).

Allylamines

La classe des allylamines, qui inclut notamment la terbinafine, regroupe des molécules de choix pour le traitement des mycoses onguaires dues aux dermatophytes (Georgopapadakou et Walsh, 1996). La terbinafine agit en inhibant l'action de la squalène époxydase, ce qui conduit d'une part à une déficience en ergostérol dans la membrane de la cellule (effet fongistatique) (Jamieson, 2006) et d'autre part à une accumulation de squalène dans la cellule, provoquant la destruction de celle-ci (effet fongicide) (Elewski, 1998; Roberts *et al.*, 2003).

Azoles

La mise sur le marché des molécules triazolées comme le fluconazole, l'itraconazole et plus récemment le voriconazole ont permis de nets progrès dans le traitement des mycoses cutanées et systémiques et de certaines mycoses sous-cutanées (Hay, 2006; Venkatesan *et al.*, 2005), en complément des imidazoles tels que le cétoconazole. Ces molécules de synthèse agissent par liaison avec une enzyme du cytochrome P450, la lanostérol déméthylase, durant la synthèse de l'ergostérol en interférant avec la déméthylation du lanostérol. Les fonctions associées à la membrane et sa fluidité sont ainsi altérée du fait de la diminution de la concentration en ergostérol et de l'accumulation de méthylstérols (Elewski, 1998; Jamieson, 2006; White *et al.*, 1998). Les effets secondaires de ces molécules sont dus à ce mécanisme, les enzymes du cytochrome P450 intervenant dans un grand nombre de voies de biosynthèses. En se liant moins fortement avec ces enzymes que le cétoconazole, le fluconazole et l'itraconazole possèdent donc moins d'effets secondaires et en particulier un moindre risque hépatotoxique (Elewski, 1998).

Le cétoconazole, premier imidazole oralement actif sur les dermatophytes et les levures, et développé dans les années 1980, est utilisé pour traiter les mycoses superficielles et systémiques, par voie orale ou topique. Une possible hépatotoxicité de cette molécule a été relevée (Elewski, 1998; Weitzman et Summerbell, 1995). Le fluconazole quant à lui peut être administré oralement ou par voie

intraveineuse pour traiter les infections superficielles et systémiques à dermatophytes, à *Candida*, ainsi que certaines infections à *Cryptococcus* (Elewski, 1998; Jamieson, 2006). L'itraconazole est indiqué dans les cas des onychomycoses, de mycoses systémiques à *Candida*, d'aspergilloses invasives, d'infections à *Cryptococcus* ou d'histoplasmoses par exemple, par voie orale ou intraveineuse (Jamieson, 2006). L'itraconazole, insoluble dans l'eau et devant donc nécessairement être formulé en association avec des cyclodextrines pour son administration, reste cependant d'emploi difficile au vu des difficultés de prédiction de sa capacité d'absorption par voie orale (Jamieson, 2006; Venkatesan *et al.*, 2005). Son utilisation par exemple dans le traitement des teignes (*tinea corporis*, *tinea manuum*, *tinea pedis*) aboutit malgré tout à de bons résultats (Weitzman et Summerbell, 1995). Le voriconazole enfin est indiqué dans le cas des aspergilloses invasives et des candidémies en particulier, par voie orale et intraveineuse (Jamieson, 2006).

Echinocandines

L'introduction ces dernières années d'une nouvelle famille de composés antifongiques, les échinocandines, dont fait partie la capsofungine active contre les candidoses et les aspergilloses invasives, ont permis de grandes avancées dans le traitement des infections fongiques. La capsofungine ne possède cependant à l'heure actuelle pas de préparation par voie orale, ce qui limite son spectre d'action (Venkatesan *et al.*, 2005). Cette classe de molécules possède un mode d'action innovant, inhibant la synthèse du 1,3- β -D-glucane, constituant des membranes cellulaires leur conférant rigidité et intégrité (Baixench *et al.*, 2007; Jamieson, 2006). L'enzyme impliquée étant présente chez la plupart des champignons pathogènes mais absente des cellules de mammifères, les risques d'effets secondaires sont donc diminués.

Griséofulvine

La griseofulvine quant à elle reste un traitement de choix dans le cas des infections à *T. tonsurans* (*tinea capitis*) ou des mycoses des pieds dues à *T. mentagrophytes* ou *T. rubrum* lorsqu'elles sont résistantes aux composés azolés ou présentent un caractère chronique, et ce d'autant plus que cette molécule est facilement accessible dans la plupart des pays tropicaux (Hay, 2006; Weitzman et Summerbell, 1995). Elle agit en inhibant la synthèse des acides nucléiques, bloquant ainsi la mitose et empêchant la synthèse des parois cellulaires (Elewski, 1998; Roberts *et al.*, 2003). Son efficacité pour le traitement des infections dues à des dermatophytes vient du fait qu'elle possède la propriété de s'accumuler dans la kératine. Bien tolérée pour le traitement des mycoses chez les enfants, biodisponible par voie orale, elle présente cependant une foetotoxicité et un effet tératogène chez l'animal et est donc déconseillée avant et pendant une grossesse (Jamieson, 2006; Roberts *et al.*, 2003). Chez l'homme, les effets secondaires les plus remarquables sont une hypersensibilité de la peau (7 % des patients) ainsi que des maux de tête, nausées et photosensibilité (8-15 % des patients) (Elewski, 1998).

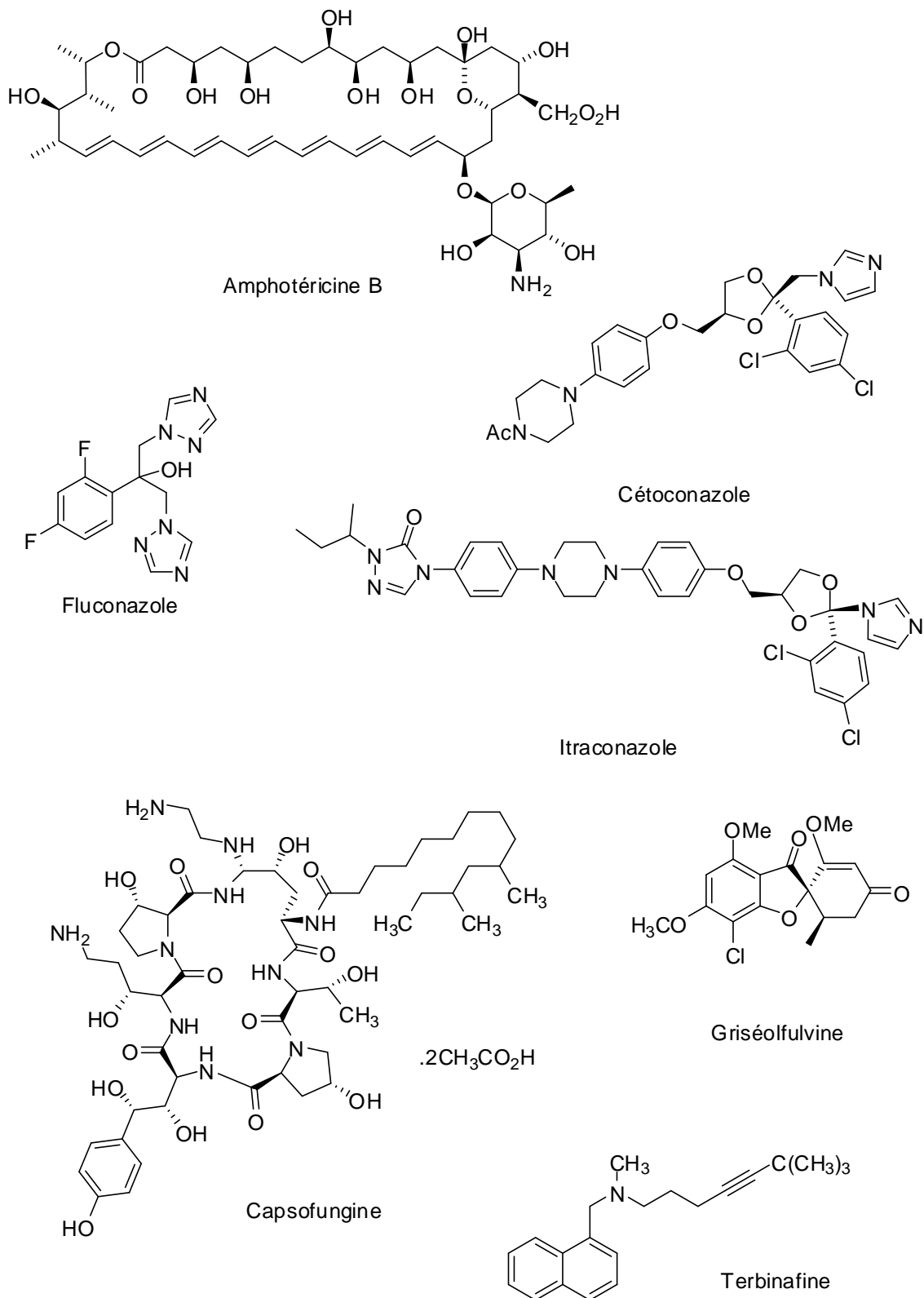


Figure 44 : Structure de quelques antifongiques usuels

La question du développement des résistances

Les phénomènes de résistance *in vitro* de certaines souches peuvent être soit d'origine intrinsèque, la résistance étant inhérente à l'espèce et s'étant développée au cours de l'évolution de la souche, soit d'origine acquise, lorsque la résistance émerge d'une population autrefois sensible au traitement (Martinez-Rossi et Peres, 2008; White *et al.*, 1998). Le développement de certains phénomènes de résistance a été observé ces dernières années en parallèle à l'utilisation croissante des antifongiques en prophylaxie et pour des traitements longs dans le cas de patients immunodéprimés (White *et al.*, 1998). La résistance peut se définir soit comme un phénomène *in vitro* lié à une augmentation de la CIM soit comme un phénomène clinique défini comme la persistance ou la progression d'une infection en dépit d'une thérapie antimicrobienne appropriée (Baixench *et al.*, 2007; White *et al.*, 1998). Entre ces deux phénomènes interviennent en particulier l'état immunitaire de l'hôte et la biodisponibilité du traitement (White *et al.*, 1998).

La résistance des isolats cliniques de *Candida* aux antifongiques du marché est par exemple un défi majeur dans le cadre de la recherche de thérapies contre les mycoses (Miceli *et al.*, 2011). Dans le cas de *C. albicans*, la capacité des levures à former des biofilms accroît encore les phénomènes de résistance, les cellules impliquées dans un biofilm étant moins sensibles aux thérapies que celles cultivées en suspension (White *et al.*, 1998). La résistance des *Candida* vis-à-vis de l'amphotéricine B reste rare, mais elle est par exemple plus courante dans le cas des pathogènes émergents tels que *Fusarium* ou *Trichosporon* (Georgopapadakou et Walsh, 1996). Des phénomènes de sélection de souches de *C. albicans* moins sensibles aux antifongiques azolés chez des patients VIH-positifs atteints de candidoses oropharyngées et traités de façon massive par l'emploi de fluconazole ont par exemple été remarqués au début des années 1990 (Georgopapadakou et Walsh, 1996; Warnock, 2007). Ce phénomène de résistance est cependant beaucoup plus marqué dans le cas de *C. glabrata*, deuxième cause de mycoses systémiques en Amérique du Nord, où 5 à 10 % des isolats cliniques sont résistants au fluconazole (Nucci et Marr, 2005; Venkatesan *et al.*, 2005; Warnock, 2007). Dans le cas de *C. parapsilosis*, une souche résistante au fluconazole a par exemple été mise en évidence du fait de l'utilisation de cette molécule en prophylaxie pour les soins de néonatalogie. Des cas de résistances *in vitro* au fluconazole ont également été relevés pour des isolats de *T. rubrum* (Santos et Hamdan, 2007). Des échecs peuvent également advenir pour cette espèce en cas de traitement à la capsosungine (Miceli *et al.*, 2011). Quant à *C. krusei*, tout comme *Aspergillus fumigatus*, il est intrinsèquement résistant au fluconazole et au cétoconazole. (Venkatesan *et al.*, 2005; Warnock, 2007; White *et al.*, 1998). Quelques résultats ont également mis en évidence une augmentation de la valeur de la concentration d'inhibition minimale (CIM) voire un développement de résistances pour certains isolats de *Candida* spp. (*C. parapsilosis*, *C. albicans*, *C. glabrata*, *C. krusei*) vis-à-vis des échinocandines, en particulier la capsosungine, dans des cas

d'immunosuppression sévère, de candidémies chroniques et d'exposition prolongée au traitement (Baixench *et al.*, 2007; Miceli *et al.*, 2011; Nucci et Marr, 2005).

L'augmentation de la prévalence des infections fongiques, couplée à une résistance accrue aux antifongiques et à des problèmes de toxicité rencontrés sur le long terme avec les traitements actuels, rend donc nécessaire la recherche de nouveaux traitements des mycoses (Venkatesan *et al.*, 2005; White *et al.*, 1998). De plus, les traitements conventionnels de ces maladies sont limités par comparaison avec les antibiotiques disponibles pour traiter les infections bactériennes, les cellules eucaryotes des champignons étant beaucoup plus proches des cellules humaines que ne le sont les cellules procaryotes des bactéries (Jamieson, 2006; Martinez-Rossi et Peres, 2008). Enfin, certains traitements restent difficilement accessibles, en particulier dans les zones tropicales pourtant largement touchées par les mycoses (Hay, 2006). En conséquence, un intérêt croissant pour les plantes médicinales comme alternative aux molécules de synthèse se développe actuellement, même si il n'existe pour le moment pas de médicament d'origine végétale ou qui en soit directement inspiré. Cette recherche de substances biologiquement actives a encouragé, parmi d'autres voies, l'étude et l'utilisation des huiles essentielles (Rios et Recio, 2005).

C. Etude de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* (Linden) Ronse : une belle plante de Guyane contre les mycoses

1. *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse (Plantaginaceae) : état de l'art



Figure 45 : *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse
(photographie A. Jahn)

Otacanthus azureus (Linden) Ronse (Figure 45) est une espèce anciennement membre de la famille des Scrophulariaceae et récemment reclassée parmi les Plantaginaceae (Albach *et al.*, 2005). Originaire du Brésil (états de Rio de Janeiro et Espírito Santo, dans la région de la Mata Atlântica), elle est également présente en Amazonie (Manaus (Amazonas), Guyane française, Colombie) ou naturalisée dans des zones sub-tropicales (Madagascar, Seychelles, île Maurice, Réunion, Hawaï).

Cette espèce fut introduite en Europe en 1861 et nommée à la fois *O. coeruleus* par le botaniste Lindley et *Stemodia azureus* par son confrère Linden en 1862. Cultivée en serre pour l'ornement de la seconde moitié du XIXe siècle jusqu'au début du XXe siècle, elle disparut ensuite de ces régions jusqu'en 1977, date à laquelle elle fut réintroduite pour la culture (De Pooter *et al.*, 1989). L'espèce étudiée ici est recensée sous le nom d'*O. caeruleus* Lindl. par le Missouri Botanical Garden¹³ avec pour synonyme *O. azureus* (Linden) Ronse. Une révision taxonomique du genre *Otacanthus* a été effectuée (Ronse, 2001). La systématique de cette espèce peut être présentée comme suit :

- Classe : Equisetopsida
- Sous-classe : Magnoliidae
- Sur-ordre : Asteranae
- Ordre : Lamiales
- Famille : Plantaginaceae Juss.
- Genre : *Otacanthus* Lindl.
- Espèce : *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse
- Synonymes : *O. caeruleus* (Lindl.), *Stemodia azurea* (Linden), *Tetraplacus tauberti* (Mez.)



Figure 46 : *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse : détail d'une feuille (à gauche) et fleur (à droite)

Il s'agit d'une herbacée terrestre pérenne de 1 à 2 m de hauteur environ portant de larges inflorescences terminales d'un violet très vif et lumineux. Les feuilles, simples, opposées, à limbe décurrent, discolores, sont couvertes de minuscules poils glandulaires et légèrement collantes au toucher (Figure 46). En les froissant, il s'en dégage une forte odeur aromatique, mentholée, résineuse, rappelant l'encens. Cette plante est ainsi connue sous le nom vernaculaire de « fleur

¹³ Tropicos.org. Missouri Botanical Garden. 17 Nov 2010 <<http://www.tropicos.org/Name/50078854>>

d'encens » en Guyane française et « incenso » au Brésil, ou « fleur cirage » à la Réunion, son odeur évoquant également l'encaustique. Elle est également nommée « Brazilian Snapdragon », ses fleurs évoquant la gueule ouverte de ces créatures fantastiques.

D'un point de vue écologique, *O. azureus* est à l'origine une espèce héliophile des habitats rocheux de la zone côtière de la Mata Atlântica. Cette espèce ne fait l'objet d'aucune mesure particulière de protection, mais du fait de sa zone de distribution réduite et de ses besoins écologiques spécifiques, elle reste cependant vulnérable comme la plupart des espèces de ce genre. Il peut être déduit d'après les herbiers déposés pour les différentes espèces d'*Otacanthus* dans les zones où cette plante est rencontrée que la floraison s'effectue tout au long de l'année, avec des pics remarquables en août-septembre et mai-juin (Ronse, 2001). En particulier, les échantillons déposés à l'Herbier de Guyane indiquent une floraison en avril, mai et août, mais pas en novembre. Aucun autre usage que l'aspect ornemental ou le potentiel de cette espèce à fournir des fleurs coupées du fait de sa couleur bleu-violet inhabituelle n'a été relevé dans la littérature (Anderson, 2004).

Lors d'une étude comparative, dix taxa de cinq espèces d'*Otacanthus* et trois formes intermédiaires ont été étudiés pour leur contenu en huiles essentielles, dont la composition a mis en évidence dans chaque cas un mélange d'une trentaine à une centaine de mono- et sesquiterpènes (Ronse *et al.*, 1997). Le rendement le plus important a été obtenu pour *O. azureus* avec une quantité d'huile obtenue représentant 0,2 % du poids de la plante fraîche, ce résultat étant proche de celui obtenu par De Pooter *et al.* (0,2 à 0,3 % suivant le stade de maturité de la plante) (De Pooter *et al.*, 1989). Une analyse de la composition de ces huiles a mis en évidence des similarités entre *O. azureus* et *O. fernandesii*, deux espèces possédant des caractères morphologiques intermédiaires communs (absence ou faible présence de poils non glandulaires sur les parties végétatives de la plante) (Ronse, 2001). Un travail supplémentaire a été mené en 2006 sur les huiles essentielles de différentes parties d'*O. azureus*, conduisant dans ce cas pour les feuilles à un rendement en huile essentielle de 0,4 % par rapport au poids de plante fraîche, et à une composition proche de celle décrite dans les études précédentes : des monoterpènes majoritaires issus du groupe des pinanes (*trans*-pinocarvéol, pinocarvone, myrtenal, α -pinène), une présence en quantité importante de β -copaène-4- α -ol en plus de sesquiterpènes tels que le viridiflorol, l' α -copaène ou la β -opoplénone (Andrade *et al.*, 2006).

2. Obtention de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* (Linden) Ronse

Dans le cas de l'étude menée ici, les parties aériennes de la plante (feuilles, tiges et fleurs) ont été distillées. Les valeurs de rendement obtenues ont été de 0,04 % pour le premier lot (mars 2007) et 0,03 % pour le second (mars 2008) par rapport au poids de plante fraîche. Ces valeurs sont très inférieures aux chiffres donnés par Ronse (pousses en fleurs) et De Pooter (feuilles) cités plus haut (De Pooter *et al.*, 1989; Ronse *et al.*, 1997), ainsi qu'à celle obtenue pour l'huile essentielle de feuille (0,4 %) par Andrade *et al.* (Andrade *et al.*, 2006). Elles sont cependant du même ordre de grandeur que celles obtenues par ces derniers auteurs pour les huiles essentielles de tiges et de fleurs, avec dans les deux cas moins de 0,05 % d'huile essentielle obtenue (Andrade *et al.*, 2006).

Ces différences dans le cas des huiles obtenues à partir de l'intégralité des parties aériennes de la plante peuvent être expliquées par des différences de terrain, de maturité de la plante ou de saison de récolte entre les distillations réalisées par les différents auteurs (Assad *et al.*, 1997; Figueiredo *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009), ou par un ratio feuilles / tiges / fleurs différent. Dans le cas de notre étude, pour une plante récoltée au même endroit à la même saison à deux années différentes, les valeurs sont en effet presque identiques, et d'autres distillations effectuées plus tardivement dans la saison ont permis d'obtenir des valeurs de rendements plus importantes (0,06 % en mai et jusqu'à 0,12 % en juin 2007). Ces résultats vont donc effectivement dans le sens d'une variation marquée du rendement en huile suivant la saison de récolte. Un autre facteur, technique celui-ci, peut également expliquer les faibles valeurs de rendement : le fait que l'hydrodistillateur artisanal utilisé au laboratoire ne permette pas de récupérer l'huile essentielle de façon optimale. Un essai réalisé sur 30 g de plante avec un hydrodistillateur de la Pharmacopée (de type Clevenger) a en effet permis de mesurer un rendement en huile de 0,1 % par rapport au poids de plante fraîche après 3 heures de distillation. Il est donc possible que les chiffres obtenus pour les deux lots étudiés ici soient légèrement sous-estimés.

L'huile obtenue possède une odeur très agréable, sucrée, miellée et boisée, avec des notes d'encens et un caractère camphré et herbal rappelant les bonbons au pin.

La majeure partie du travail décrit ici (détermination des constituants de l'huile et recherche d'effets synergiques) a été effectuée sur le second lot, mis en évidence comme le plus actif des deux lors d'essais *in vitro* sur des levures et des champignons filamenteux (voir plus bas).

3. Détermination de la composition de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* (Linden) Ronse par GC/MS

La description exhaustive de la composition de l'huile obtenue, les indices de rétention et les stratégies analytiques utilisées pour l'identification des différentes molécules sont présentés en annexe (Annexe 13). Les molécules sont organisées en fonction de leur structure chimique. La distinction entre les familles de molécules aurait parfois pu être affinée, par exemple en ajoutant le sous-groupe des aromadendranes – dont fait partie le viridiflorol – au groupe des germacrane dont ils sont issus, ou en distinguant les muurolanes dans le groupe des cadinanes et dérivés, parmi lesquels ils se différencient selon la stéréochimie de la jonction des cycles et la position axiale ou équatoriale du groupement isopropyle (Cavalli, 2002), ou encore tenir compte du nombre de cycles observés.

Pour identifier les constituants de l'huile essentielle, plusieurs techniques ont été utilisées :

- La comparaison des indices de rétention (indices de Kovats) calculés avec ceux donnés dans la littérature, couplée avec la comparaison des spectres de masse obtenus avec ceux des bases de données de référence disponibles dans le logiciel MSWorkStation (Varian) : NIST08 et ADAMS. Pour les indices de rétention, les données de référence choisies sont celles décrites par Adams (Adams, 1995)¹⁴ et Courtois *et al.* (Courtois *et al.*, 2009), étude dans laquelle les molécules ont été décrites dans des conditions très proches de celles rencontrées ici.
- La comparaison des données obtenues par injection ou co-injection de standards commerciaux,
- La comparaison des spectres de masse et des temps de rétention des molécules du mélange à ceux des composés d'une bibliothèque réalisée au laboratoire à partir d'huiles essentielles commerciales de composition connue (Aroma-Zone),
- L'analyse RMN ¹H de l'huile essentielle (voir plus bas) et la comparaison des signaux obtenus avec les données de la littérature pour confirmer l'identification des molécules majoritaires.

Pour les cas les plus difficiles, l'aide d'un spécialiste (Jean-Marie Bessière) a permis d'identifier quelques molécules supplémentaires par l'étude de leur spectre de masse.

Certains partis ont été pris, concernant par exemple les isomères *cis* et *trans* du *para*-mentha-2,8-diéno. L'identification attribuée (isomère *trans*, IK 1126, avant l'isomère *cis*, IK 1142) correspond à l'ordre d'élution donné par Adams, avec des indices de Kovats de 1126 et 1134 pour les isomères *trans* et *cis* respectivement (Adams, 1995), ou 1123 et 1138 (Adams *et al.*, 2005). L'identification inverse (isomère *cis* avant le *trans*) a cependant été relevée dans la littérature (Asuming *et al.*, 2005;

¹⁴ Accès à ces valeurs par les sites <http://www.pherobase.com> et <http://webbook.nist.gov/chemistry/>

Gallori *et al.*, 2001), cet ordre d'élution correspondant en effet à celui le plus fréquemment rencontré en chromatographie en phase gaz sur colonne apolaire pour les diastéréoisomères - cas des hydrates de sabinène par exemple - les molécules *cis* en général plus mobiles (plusieurs conformations) interagissant moins bien avec la phase stationnaire de la colonne¹⁵.

Dans le cadre de cette analyse, 86 composés ont été identifiés, ce qui représente près de 95 % de la composition totale de l'huile essentielle étudiée (94,8 %). De façon générale et sans tenir compte des composés non identifiés, l'huile est majoritairement sesquiterpénique, avec 27 % de sesquiterpènes hydrocarbonés et 46 % de sesquiterpènes oxygénés. Les monoterpènes représentent donc 21 % du total des molécules identifiées, avec une forte représentation des composés de la classe des pinanes (15 % de l'huile, soit plus de 70 % des monoterpènes identifiés, représentés en particulier par le myrténal, le *trans*-pinocarvéol et la pinocarvone), ce qui correspond à la description faite par Andrade *et al.* (2006). Les sesquiterpènes les plus représentés sont les molécules de la famille des cadinanes et leurs dérivés, avec 45 % de l'huile (62 % des sesquiterpènes identifiés).

Les molécules les plus abondantes identifiées dans l'huile (proportions calculées par intégration des pics du chromatogramme) sont le β -copaène-4- α -ol (23,3 %), l' α -humulène (10,6 %), l' α -copaène (8,8 %), le myrténal (5,6 %) et le viridiflorol (5,1 %). A elles seules ces 5 molécules représentent 53,4 % du contenu total de l'huile essentielle obtenue. Le *trans*-pinocarvéol (4,3 %) et un isomère non déterminé du bulnésol (4,1 %) sont également présents en quantités importantes (Figure 47).

Cette composition est proche de celles décrites par Andrade *et al.* (2006), Ronse *et al.* (1997) et De Pooter *et al.* (1989). Dans les trois cas, le β -copaène-4- α -ol, molécule possédant une forte odeur d'encens rappelant le parfum caractéristique de la plante fraîche, était soit majoritaire (15,6 % pour Andrade *et al.*) soit présente, mais l'huile obtenue ici se caractérise par une proportion de cette molécule plus importante que les valeurs rencontrées dans la littérature. L' α -humulène (odeur boisée) et l' α -copaène (odeur à caractère plus floral) sont également présentes en quantités plus importantes que ce qui est décrit dans la littérature, où les huiles possèdent au contraire une proportion plus élevée en pinocarvone (de 6,5 à 12 %, contre 2,6 % seulement ici). De façon générale, les huiles décrites étaient également plus riches en monoterpènes, avec par exemple des pourcentages en α - et β -pinènes de 2,7 à 6,2 %, contre seulement 1,3 et 0,8 % dans notre cas. Certaines molécules comme le bulnésol (isomère non déterminé), l'oxyde d'humulène, le cadalène ou les isomères du cubébol sont à notre connaissance décrites pour la première fois dans l'huile essentielle d'*Otacanthus* sp., toutes espèces confondues.

¹⁵ Comm. pers. Jean-Marie Bessière.

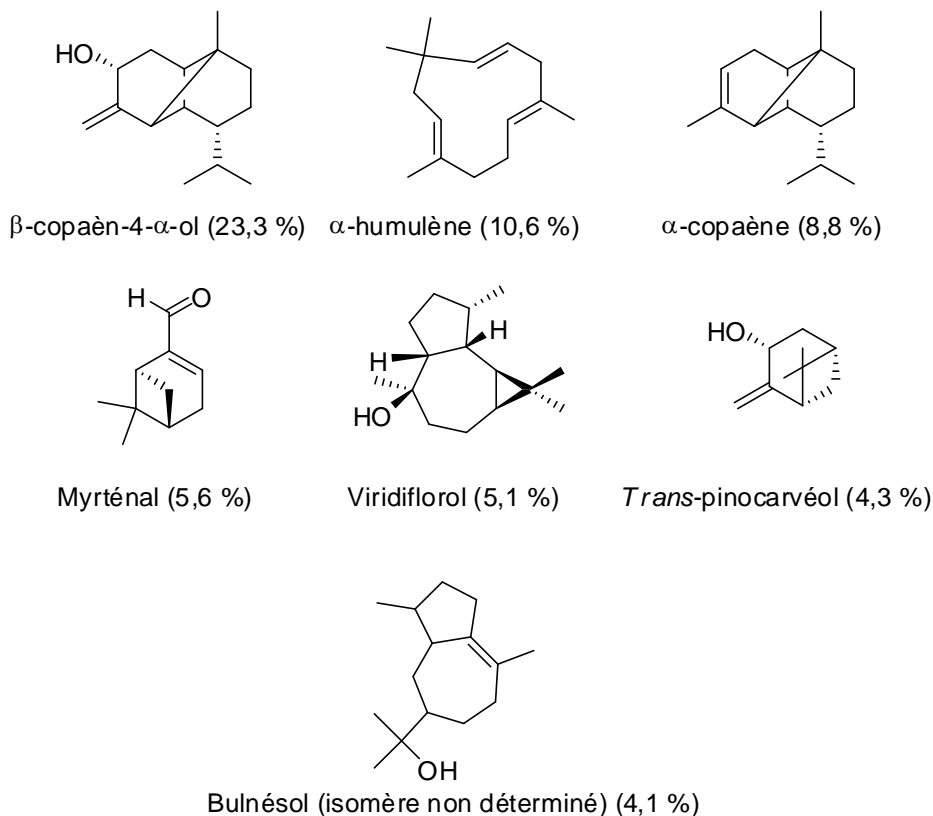


Figure 47 : Structure et proportion relative des molécules majoritaires de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* (Linden)
Ronse

4. Confirmation de l'identification des molécules majoritaires par RMN ^1H

Afin de confirmer l'identification des molécules majoritaires, un spectre de RMN du proton du mélange a été effectué dans le CDCl_3 . Des spectres ^1H ont également été obtenus dans les mêmes conditions pour les standards commerciaux suivants : α -humulène, α -copaène, myrténal, et *trans*-pinocarvéol, afin de comparer les données avec une meilleure précision. Le β -copaèn-4- α -ol, molécule majoritaire, n'ayant pu être obtenu commercialement, il a été isolé de l'huile essentielle par chromatographie sur colonne de silice puis également analysé par RMN, son identification étant confirmée par comparaison avec les données de la littérature (de Buyck *et al.*, 1989). De même, le viridiflorol n'a pu être obtenu commercialement, mais une fraction contenant un mélange de β -copaèn-4- α -ol et de viridiflorol a été obtenue suite au fractionnement sur colonne de silice et a donc permis de vérifier l'identification de cette molécule par comparaison avec les données de la littérature (Bombarda *et al.*, 2001).

Le fractionnement des huiles essentielles préalablement à leur analyse est réalisé par de nombreux auteurs (Boti *et al.*, 2006; Cavalli *et al.*, 2003; Lago *et al.*, 2007; Lago *et al.*, 2009) et peut être effectué de façon très poussée, comme décrit par exemple dans les travaux de Weyerstahl *et al.*

sur l'huile essentielle de *Cistus ladaniferus* L. (Weyerstahl *et al.*, 1998) ou d'*Achillea eriophora* DC. (Weyerstahl *et al.*, 1997), qui ont conduit dans le premier cas à l'identification de 186 composés, principalement grâce aux données de RMN, et à la détermination de 90 constituants dans le second cas. L'objectif du fractionnement réalisé ici était d'obtenir en particulier la molécule majoritaire suspectée, le β -copaën-4- α -ol, et non d'effectuer une étude détaillée des composés minoritaires.

Le résultat suivant a été obtenu (Figures 48 et 49). Les substituants dont les déplacements chimiques ont été observés sont présentés en Figure 50. L'intégralité du spectre de l'huile est également présentée en Annexe 14.

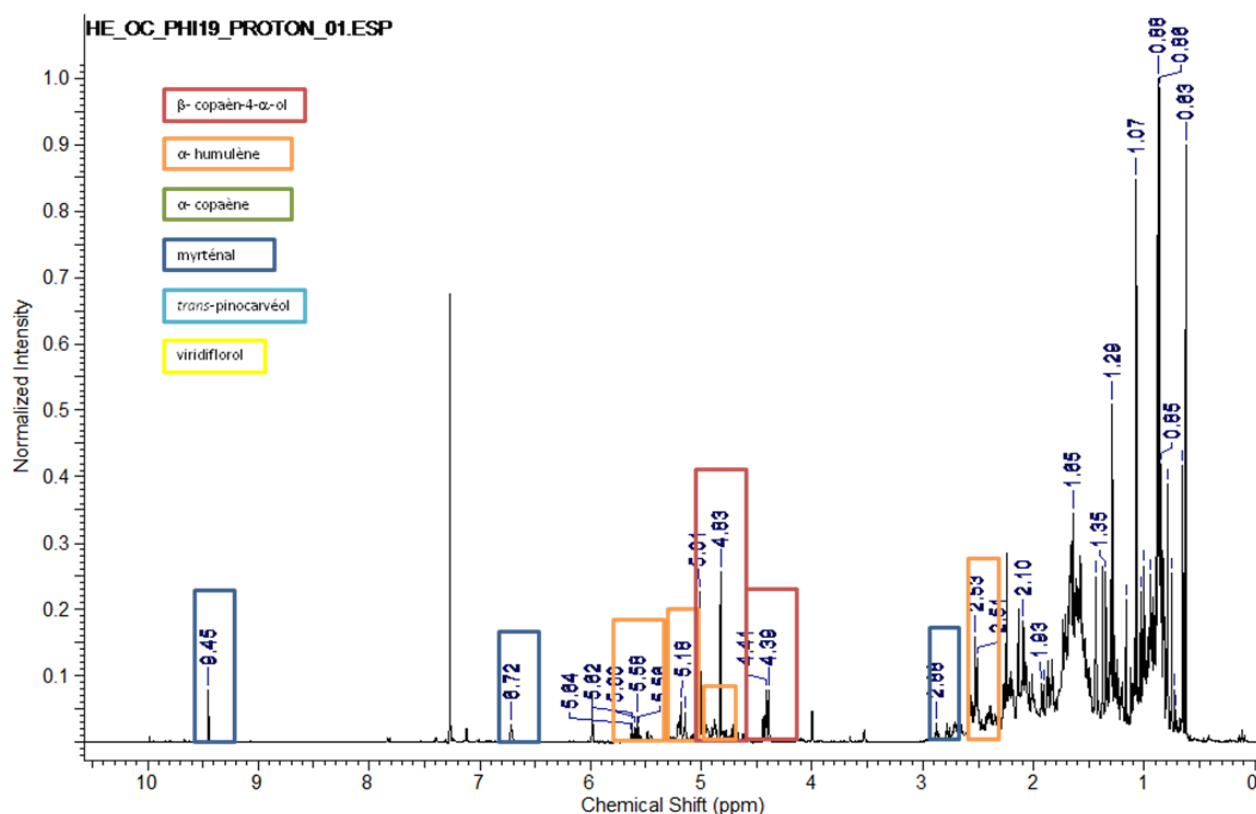


Figure 48 : Signaux caractéristiques des molécules identifiées dans le spectre de RMN ^1H de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* dans le CDCl_3 – spectre complet de l'huile essentielle

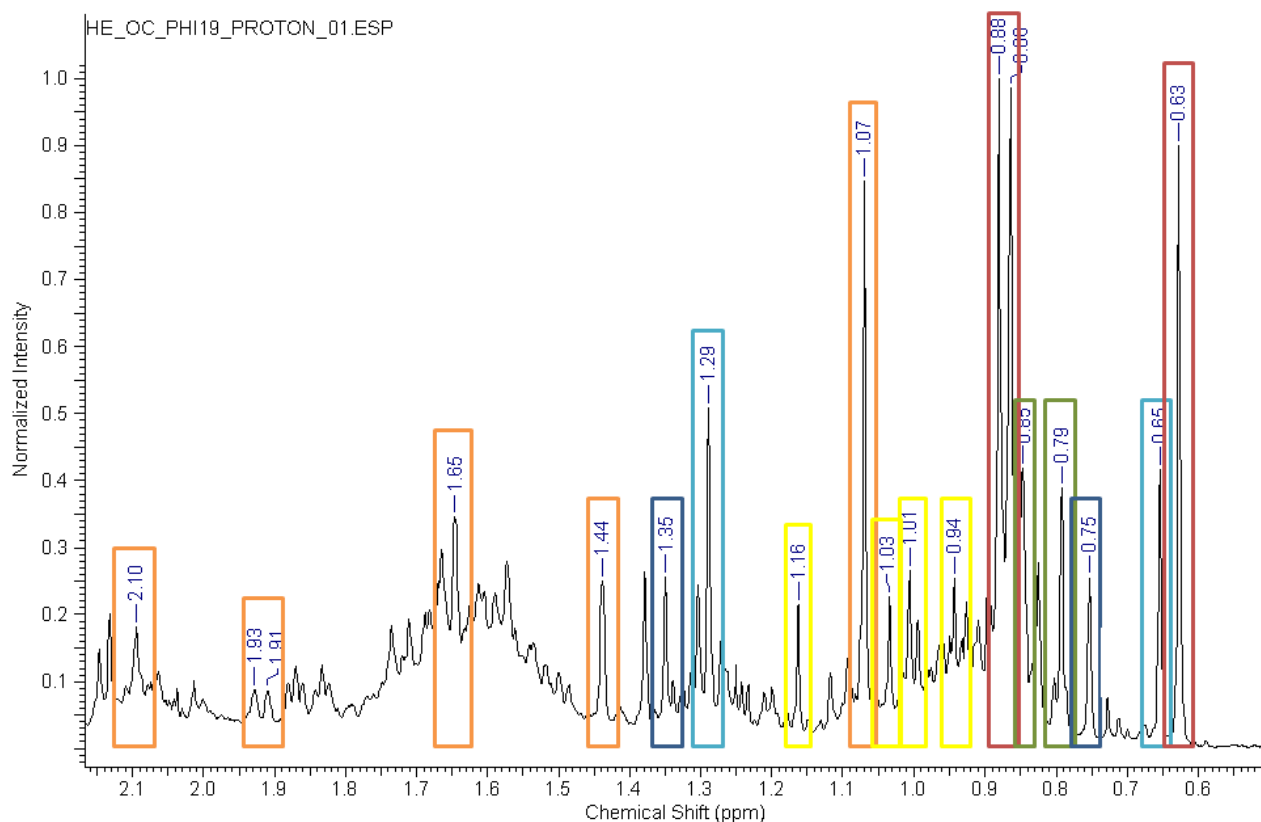


Figure 49 : Signaux caractéristiques des molécules identifiées dans le spectre de RMN ^1H de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* dans le CDCl_3 – partie du spectre correspondant aux groupements méthyles des molécules de l'huile

Le β -copaène-4- α -ol a été isolé à l'issue d'une chromatographie sur colonne de silice (spectre de RMN présenté en Annexe 15) et son identification confirmée après analyse en GC/MS par comparaison avec les données RMN fournies pour cette molécule par De Buyck *et al.* Dans la fraction pure comme dans l'huile essentielle brute se retrouvent les signaux caractéristiques décrits par les auteurs : les deux singulets correspondants aux deux protons vinyliques à 5,01 et 4,83 ppm, le doublet du proton en alpha du groupement hydroxyle à 4,40 ppm ($J = 7,3$ Hz), le doublet des deux groupements méthyle en positions 14 et 15 (0,87 ppm, $J = 6,6$ Hz) et le singulet du groupement méthyle 11 à 0,63 ppm.

L' α -humulène peut être identifié par comparaison avec le spectre du standard commercial (Annexe 16). Tous les signaux du spectre commercial sont visibles sur le spectre de l'huile, en particulier les signaux caractéristiques des deux protons situés de part et d'autre de la double liaison, un triplet de doublets situé à 5,60 ppm ($J = 15,7$; $7,4$ Hz) pour le proton vinylique (A) et un doublet large à 5,17 ppm pour le proton vinylique (B). Deux triplets à 4,96 et 4,88 ppm correspondent respectivement aux protons vinyliques (E) et (F) ($J = 6,6$ Hz pour (E) et $J = 7,4$ Hz pour (F)). Le singulet correspondant aux deux groupements méthyle (C) est nettement visible à 1,07 ppm, de même que les signaux des deux autres groupements méthyle à 1,44 et 1,65 ppm. Les signaux correspondant aux deux protons (D) (2,52 ppm, d, $J = 6,6$ Hz), aux quatre protons (F) (2,10 ppm, m) et aux deux protons (H) (1,92 ppm, d, $J = 7,4$ Hz) sont également visibles.

L' α -copaène est assez difficilement visible dans le mélange, cependant le singulet des deux groupements méthyle portés par le même carbone est bien visible à 0,79 ppm, et le signal du groupement méthyle lié au pont se trouve bien à 0,85 ppm. Le multiplet correspondant au proton vinylique peut également être distingué à 5,20 ppm. Le spectre du standard commercial est présenté en Annexe 17.

Le myrténal (spectre du standard commercial en Annexe 18) est aisément identifiable grâce au singulet du proton aldéhydique (A) présent à 9,44 ppm dans le spectre du standard commercial et à 9,45 ppm dans celui de l'huile essentielle. Le signal correspondant au proton de la double liaison (B) est également nettement visible sur le spectre du mélange (6,72 ppm, ddd, $J = 4,7 ; 3,2 ; 1,4$ Hz). Le triplet de doublet d'un des deux protons (C) peut également être distingué (2,88 ppm, dt, $J = 5,5 ; 1,2$ Hz). Enfin, les singulets correspondant aux deux groupements méthyle sont bien visibles respectivement à 1,35 et 0,75 ppm. Le doublet à 1,06 ppm n'est par contre pas visible car dissimulé par le singulet à 1,07 ppm de l' α -humulène.

Le *trans*-pinocarvéol peut être identifié par comparaison avec le standard commercial (Annexe 19) grâce à la présence des deux singulets à 0,65 et 1,29 ppm correspondant aux deux groupements méthyle de la molécule. Les signaux compris entre 1,50 et 2,50 ppm sont difficilement reconnaissables du fait du grand nombre de pics présents dans cette zone. Les signaux présents entre 4 et 5 ppm étant quasiment identiques à ceux du β -copaène-4- α -ol, ils ne peuvent être utilisés pour identifier cette molécule car masqués par ceux du composé majoritaire.

Enfin, une fraction contenant un mélange de β -copaène-4- α -ol et de viridiflorol (Annexe 20) a été obtenue à l'issue du fractionnement de l'huile essentielle, permettant de confirmer l'identification obtenue en GC/MS pour cette dernière molécule, ainsi que la présence de celle-ci dans l'huile brute. Les signaux des groupements méthyle décrits dans la publication de Bombarda *et al.* (2001) correspondent à ceux relevés dans l'huile essentielle, avec des singulets à 1,16 ; 1,03 ; 1,01 et un doublet à 0,93 ppm respectivement pour les groupements méthyle 14, 12, 13 et 15.

L'identification du bulnésol n'a pas été vérifiée dans le cadre de cette analyse. Une étude plus approfondie du spectre de RMN pourrait peut-être permettre de déterminer la nature de l'isomère rencontré dans l'huile essentielle.

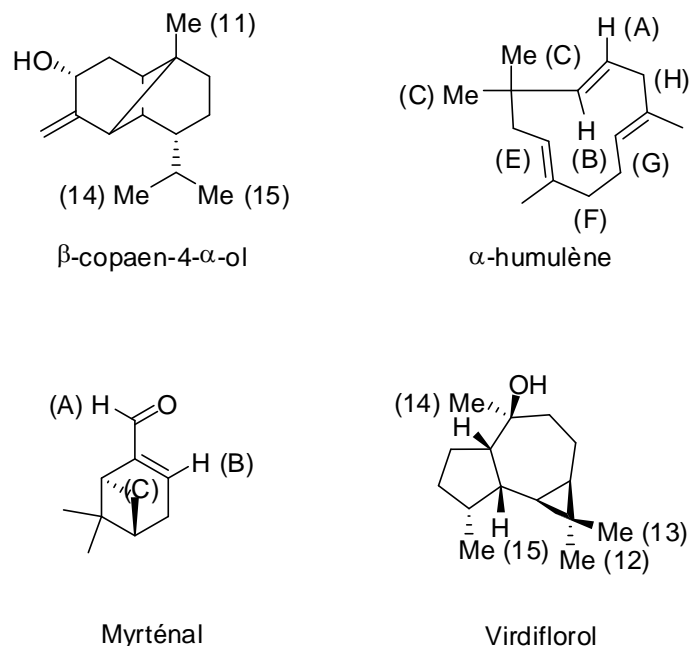


Figure 50 : Substituants des molécules de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* dont les déplacements ont été identifiés en RMN (α -copaène non représenté)

L'analyse du spectre de RMN du proton du mélange, bien que complexe, permet donc de vérifier les identifications des constituants majoritaires de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus*. Une des limitations de cette technique en première approche reste donc le fait qu'elle ne permet que le contrôle de la présence d'un composé préalablement identifié ou suspecté suite à une autre approche (Cavalli, 2002). L'analyse unidimensionnelle du spectre proton dans le cas d'huiles essentielles reste cependant recommandée par certains auteurs comme Malcher *et al.*, qui utilisent cette technique pour la caractérisation des profils chimiques de plusieurs chemotypes d'huile (Malcher *et al.*, 2004). Cette technique permet également d'effectuer un dosage précis des proportions relatives des constituants majoritaires d'un mélange. Dans une autre perspective, l'obtention de données spectroscopiques en résonance magnétique nucléaire, en particulier de signatures métaboliques d'extraits bruts par RMN ^1H , peut être à la base d'analyses métabolomiques qualitatives et quantitatives (Verpoorte *et al.*, 2007; Ward *et al.*, 2003).

Afin d'améliorer les résultats obtenus (meilleure précision, plus grand nombre de composés identifiés...) plusieurs techniques pourraient également être utilisées en complément :

- Des analyses simples des corrélations proton-proton (COSY) ou proton-carbone (HSQC, HMBC) pourraient permettre d'affiner les résultats en associant certains des signaux entre eux,

- L'utilisation de la méthode DOSY (Diffusion Order SpectroscopY), qui en présentant dans sa configuration bidimensionnelle la mesure de la diffusion comme un axe spectroscopique supplémentaire – le premier axe étant celui des déplacements chimiques - permet ainsi de discriminer les composants d'un mélange le long de l'axe de diffusion (Gostan *et al.*, 2004). Le phénomène de diffusion est à la fois lié aux propriétés de chaque molécule (taille, forme, poids, charge...) et à celles de leur environnement (concentration, température, état d'agrégation). Chaque composé d'un mélange peut donc être séparé en fonction de son coefficient de diffusion propre, en particulier les molécules ayant des déplacements chimiques identiques mais des masses différentes (Novoa-Carballal *et al.*, 2011).

Cette technique a par exemple été utilisée pour analyser la composition de préparations phytothérapeutiques utilisées pour résoudre les problèmes d'impuissance, permettant de détecter la présence des composés actifs et inactifs dans ces matrices complexes (Balayssac *et al.*, 2009). Cependant, cette méthode est plus efficace lorsque les molécules étudiées sont de tailles différentes (et ont donc des coefficients de diffusion bien différenciés), certaines limitations pourraient donc être rencontrées dans le cas de l'étude de la composition d'une huile essentielle pour lesquelles les structures des molécules présentes sont souvent proches (Bradley *et al.*, 2005; Sharman, 1999). Cette difficulté peut cependant être contournée en augmentant les différences entre coefficients de diffusion, par ajout de phases stationnaires (silice, supports pour chromatographie CLHP), de surfactants, de polymères ou d'agents de complexation (Novoa-Carballal *et al.*, 2011; Pages *et al.*, 2006).

- Les expériences TOCSY (Total Correlation SpectroscopY) permettent d'étudier les couplages scalaires des protons. Cette technique peut également être utilisée en version 1D en effectuant une excitation sélective d'un des noyaux du spectre et en transférant son aimantation aux autres noyaux à l'aide d'une période de mélange. Elle pourrait donc permettre de différencier les signaux de différents constituants de l'huile essentielle. Cette méthode a en particulier été utilisée avec succès pour l'analyse d'impuretés dans un échantillon pharmaceutique, celles-ci étant présente à hauteur de 4 % en poids de l'échantillon total (Sharman, 1999). L'auteur estime que la limite de détection de ces impuretés pourrait être descendue à 0,5 %. De même, des résultats positifs ont été obtenus dans le cadre de l'étude d'acides aminés présents dans le miel (Sandusky et Raftery, 2005). L'avantage de cette méthode par rapport à la technique DOSY est le fait qu'aucune différence de taille ou de mobilité n'est indispensable à la différenciation des composés, la seule nécessité étant l'existence d'un multiplet du système de spin clairement isolé du reste du spectre (Novoa-Carballal *et al.*, 2011).

- Des couplages DOSY / TOCSY (réalisation successives des expériences) peuvent également être réalisés, comme démontré par Bradley *et al.* (Bradley *et al.*, 2005), qui ont utilisé une TOCSY en préparation d'une expérience de DOSY pour l'étude d'un mélange de sucres.
- Le travail sur les spectres carbone-13 des mélanges est enfin devenu maintenant une approche classique d'étude de mélanges sans purification préalable des constituants. Cette technique a en particulier été développée au sein de l'équipe « Chimie et Biomasse » de l'Université de Corse, grâce à la mise en place de bases de données en ^{13}C et de méthodes d'analyse assistées par ordinateur (logiciel d'aide à l'identification) (Cavalli, 2002). L'efficacité de cette technique est liée aux caractéristiques des spectres carbone-13 : grâce à la large fenêtre spectrale, même de petites différences de structure induisent une variation mesurable du déplacement chimique. Des composés ayant le même temps de rétention en chromatographie en phase gaz où ayant des spectres de masse non suffisamment différenciés, tels que des stéréoisomères, peuvent donc malgré tout être analysés en RMN du carbone-13 (Cavalli, 2002; Mariotti *et al.*, 1997). La limite de détection de cette technique est de l'ordre de 0,5 – 1 % à partir du spectre du mélange (Mariotti *et al.*, 1997).

Dans le cadre d'une prochaine étude ou de la nécessité d'un complément d'information sur l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus*, une ou plusieurs de ces méthodes pourront donc être testées au laboratoire. Ces expériences, en particulier l'étude du spectre carbone-13, pourraient par exemple permettre de lever l'ambiguïté sur la stéréochimie du calaménène (IK 1524 ; 0,72 %). Les deux isomères (*cis* et *trans*) possèdent en effet des spectres de masse parfaitement superposables et des indices de rétention identiques aussi bien sur colonne apolaire que sur colonne polaire, ce qui empêche de les distinguer dans le cadre d'une analyse par GC/MS seulement (Cavalli, 2002).

5. Comparaison des compositions des huiles essentielles des lots 1 et 2 par GC/MS

Les chromatogrammes des deux lots d'huile essentielle obtenus préalablement à cette étude ont été comparés. Le premier lot (mars 2007) est le lot PSN43 et le second (mars 2008) est le lot Phi19. Les injections ayant été effectuées de façon qualitative et non quantitative, les échelles des deux chromatogrammes sont légèrement différentes mais permettent cependant d'apprécier les différences de proportions relatives des composés entre les deux huiles essentielles. Pour plus de rigueur, les chromatogrammes normalisés et superposés sont présentés en Annexe 21. La description détaillée de l'huile essentielle du lot 1 n'a pas été effectuée, mais quelques composés sont indiqués sur le chromatogramme afin d'en faciliter la lecture.

Les compositions des deux huiles sont proches, même s'il apparaît que la famille des monoterpènes est relativement plus représentée dans le lot PSN43 (lot 1), en particulier les monoterpènes hydrocarbonés (présents globalement de l' α -pinène au terpinolène) (*Figure 51*).

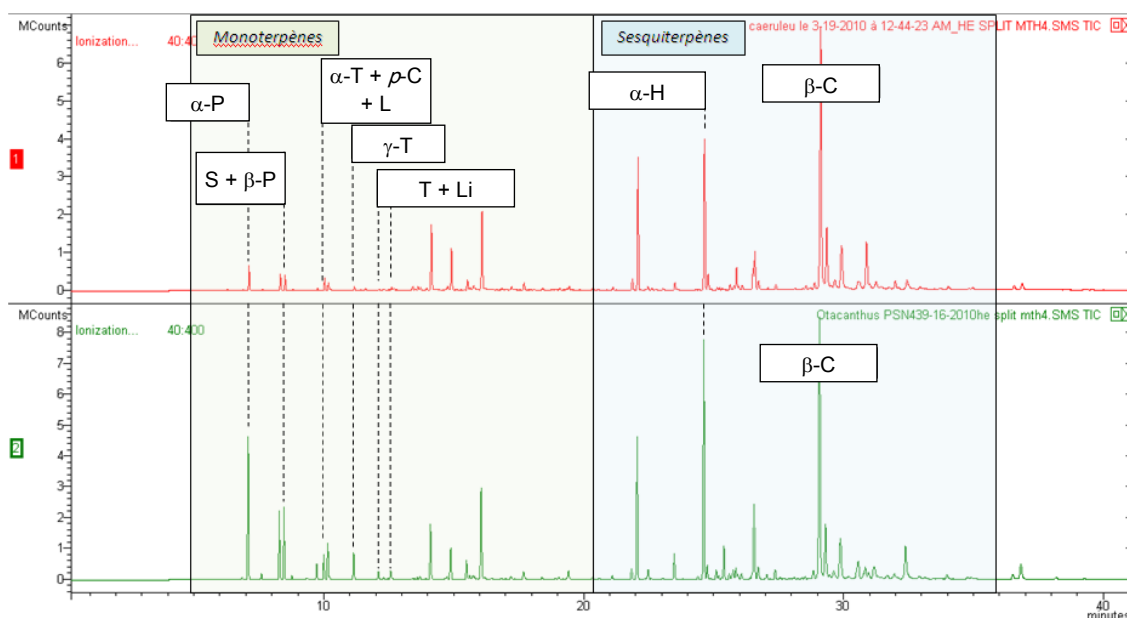


Figure 51 : Comparaison des chromatogrammes obtenus en GC/MS pour les deux lots d'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* - en haut: lot 2 (Phi19, mars 2008), en bas: lot 1 (PSN43, mars 2007) (colonne VF-5ms). Légende : α -P : α -pinène, S : sabinène, β -P : β -pinène, α -T : α -terpinolène, p-C : para-cymène, L : limonène, γ -T : γ -terpinène, T : terpinolène, Li : linalol, α -H : α -humulène, β -C : β -copaène-4- α -ol

Afin de préciser cette comparaison, les pourcentages relatifs de 37 composés parmi les plus importants quantitativement dans l'huile essentielle d'*O. azureus* sont présentés classés par familles dans le tableau suivant (*Tableau 14*). Les éventuels composés non communs aux deux lots n'ont pas été étudiés car ultra-minoritaires.

Tableau 14 : Comparaison des proportions relatives obtenues par GC/MS de 37 constituants communs aux deux lots d'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* – ⁽¹⁾ Composition donnée dans l'ordre d'élution sur colonne VF-5ms, NI: non identifié ; * Isomère non déterminé

Composés ⁽³⁾	Concentration relative (%) lot 1	Concentration relative (%) lot 2
Monoterpènes	25,8	18,7
Acycliques		
Linalol	0,5	0,2
Menthanes		
α -terpinène	0,6	0,1

<i>para</i> -cymène	1,0	0,7
limonène	1,5	0,4
γ -terpinène	1,1	0,2
terpinolène	0,3	0,1
terpinèn-4-ol	0,9	0,6
cuminaldéhyde	0,5	0,6
<i>Pinanes et dérivés</i>		
α -pinène	5,0	1,3
β -pinène	2,8	0,8
<i>trans</i> -pinocarvéol	2,5	4,4
pinocarvone	1,4	2,6
myrténal	4,7	5,6
<i>Thujanes</i>		
sabinène	2,5	0,9
acétate de sabinyle*	0,5	0,2
<i>Sesquiterpènes</i>	61,5	69,1
<i>Humulanes et caryophyllanes</i>		
β -caryophyllène	1,2	0,5
α -humulène	11,4	10,6
NI + oxyde d'humulène II	3,5	5,1
caryophylla-7(12),8-dièn-5-ol	0,5	0,2
<i>Germacrane et dérivés</i>		
alloaromadendrène	0,7	1,0
germacrène D	1,6	0,0
bicyclgermacrène	0,3	0,3
viridiflorol	3,7	5,1
bulnésol*	1,1	4,1
<i>Cadinanes et dérivés</i>		
cyclosativène + α -ylangène	0,5	0,9
α -copaène	6,6	8,8
β -cubébène	0,6	0,2
<i>trans</i> -cadina-1(6)-4-diène	0,5	0,1
<i>trans</i> -muurola-4(14),5-diène	0,6	0,2
<i>cis</i> -cubébol	0,6	1,3
δ -cadinène	4,1	2,9
calaménène*	0,8	0,7
α -calacorène	0,5	0,4
β -copaèn-4- α -ol	16,7	23,3
β -muurola-4(10),14-diéol + <i>cis</i> -cadin-4-èn-7-ol	1,8	1,3
cubénol + NI	1,4	0,8
cadalène	2,8	1,3
Total	87,3	87,8

Les comparaisons effectuées sur ces 37 molécules montrent effectivement que l'huile du lot 1 est plus riche en monoterpènes (25,8 % contre 13 % pour le lot 2), en particulier hydrocarbonés (14,8 % contre 4,4 % pour le lot 2). La proportion de sesquiterpènes hydrocarbonés est à peu près

équivalente dans les deux cas (lot 1 : 32,2 %, lot 2 : 28 %) mais les sesquiterpènes oxygénés sont plus représentés dans le lot 2 (41 % contre 29,3 % dans le lot 1).

Dans les deux cas la molécule majoritaire reste le β -copaène-4- α -ol (16,7 % dans le lot 1, 23,3 % dans le lot 2) suivie par l' α -humulène (11,4 % dans le lot 1, 10,6 % dans le lot 2) et l' α -copaène (6,6 % dans le lot 1, 8,8 % dans le lot 2). Le myrtenal, quatrième molécule majoritaire du lot 2 (5,6 %) est toujours bien présente dans le lot 1 (4,7 %). Le viridiflorol, le *trans*-pinocarvéol et le bulnésol sont également présents dans les deux lots, bien qu'en quantité inférieure dans le lot 1 pour ces trois molécules.

Concernant les monoterpènes, la différence se fait en particulier au niveau des pinènes, avec 5,0 et 2,8 % d' α - et de β -pinène respectivement dans le lot 1 contre 1,3 et 0,8 % dans le lot 2. Le sabinène, molécule de la famille des thujanes, est également plus présent dans le lot 1 (2,5 % contre 0,9 % dans le lot 2), ainsi que le limonène et l' α -terpinène, du groupe des menthanes.

Les deux lots récoltés provenant du même lieu (jardin, PK10, Piste de Bélizon), cette variation de la composition pourrait être en particulier expliquée par des possibles différences de climat entre mars 2007 et mars 2008. En Guyane, le mois de mars correspond normalement à une interruption de la saison des pluies connue sous le nom de « petit été de mars », qui se traduit par une acalmie des précipitations, avec des développements nuageux souvent générateurs de pluies nocturnes mais des journées généralement ensoleillées (Groussin, 2001). Cet intermède peut cependant être plus ou moins marqué selon les années (Gaucherel, 2002). Dans le cas des années 2007 et 2008, les données de pluviométrie relevées sur la plantation de la station de terrain de Paracou, à l'Ouest de Kourou (coordonnées GPS (Magelan) : 05° 17' 29,4" Nord, 52° 53' 43,38" Ouest) indiquent en effet des mois de mars et avril beaucoup plus pluvieux en 2007 qu'en 2008 (respectivement 364 et 537 mm en mars et avril 2007, contre 239 et 208 mm en mars et avril 2008). Les différences climatiques (humidité relative, apport en eau, température...) peuvent en effet expliquer une variation de la composition des huiles essentielles (Figueiredo *et al.*, 2008; Jordan *et al.*, 2003). Ces changements peuvent également être responsables de phénologies différentes (floraison plus ou moins marquée, présence ou pas de jeunes pousses...), ce qui conduit également à des modifications de la composition en terpènes pour les huiles essentielles, comme mis en évidence par Schwob *et al.* dans le cas d'*Hypericum perforatum* L. (Schwob *et al.*, 2004) ou par Andrade *et al.* dans le cas d'*Otacanthus azureus* (Andrade *et al.*, 2006). Enfin, il a également été démontré lors d'une étude menée sur *Calocedrus macrolepsis* var. *formosa* que le rythme circadien de la plante et la température extérieure peuvent également avoir une influence sur l'émission des composés volatils par celle-ci (Chen *et al.*, 2010). Ainsi, une mesure effectuée lors d'une journée ensoleillée a montré que les composés volatils majoritairement émis étaient en particulier l' α -pinène (19,9 %) et le (-)-limonène (54,3 %), ces pourcentages étant respectivement de 52,1 et 31,2 % pour une journée

pluvieuse, et variant également selon les heures de la journée. Les différences observées dans le cadre de notre étude peuvent donc sans doute être expliqués en première approche par une combinaison de ces différents facteurs.

Il est intéressant de rappeler que concernant les rendements cependant, une très faible différence a été notée pour les deux lots récoltés à la même période (0,04 % en mars 2007 et 0,03 % en mars 2008), alors que les rendements obtenus plus tard dans la saison (mai ou juin) étaient plus élevés (0,06 et 0,12 % respectivement). Le fait que les rendements soient quasi-identiques et les compositions légèrement différentes pourrait peut-être être expliqué par le fait que les variations de conditions climatiques ont dans ce cas une influence plus marquée sur la composition en volatils que sur la quantité de ces molécules, mais des études plus poussées de la biologie et de la biochimie de la plante devraient être réalisées pour obtenir plus de précisions.

6. Activité biologique de l'huile essentielle d'*O. azureus* et des ses constituants

L'évaluation de l'activité antifongique a été réalisée par une méthode de microdilution consistant à mettre en contact les huiles essentielles et molécules testées avec une solution de mycélium en milieu de culture liquide. Avec cette approche, il est possible de lire la concentration inhibitrice minimale (CIM, calculée en $\mu\text{g/ml}$) en observant l'absence de croissance du champignon dans certains puits. Les produits utilisés comme contrôles positifs sont des antifongiques de référence : l'itraconazole dans le cas de l'ensemble des souches testées, ainsi que le fluconazole pour les levures, les CIM relevées pour cette molécule dans les cas des dermatophytes étant généralement élevées et donc non discriminantes.

Les souches choisies sont réparties en deux groupes : des espèces du genre *Candida*, une des causes les plus importantes de mycoses superficielles dans les zones tropicales, et systémiques sur l'ensemble de la planète, ainsi que des champignons filamenteux responsables des teignes (*Trichophyton* spp. et *Microsporum* spp.) aussi bien dans les régions tempérées qu'en milieu tropical (Hay, 2006; Warnock, 2007).

Les résultats obtenus sur les deux lots d'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* ainsi que sur les molécules identifiées comme majoritaires dans l'huile sont présentés dans le tableau suivant (*Tableau 15*). Le β -copaène-4- α -ol testé est issu du fractionnement sur colonne de silice effectué sur l'huile essentielle brute. Le viridiflorol n'a pu être isolé seul, mais une fraction contenant un mélange de β -copaène-4- α -ol et de viridiflorol a cependant été incluse dans le cadre de cet essai. Les produits bruts (huiles essentielles) sont préparés de façon à obtenir une concentration de départ de 500 $\mu\text{g/ml}$, et de 64 $\mu\text{g/ml}$ pour les produits purs. Les valeurs minimales permettant de considérer qu'un extrait ou

une molécule sont actives contre les souches testées sont fixées à 125 µg/ml pour les huiles. Cette valeur correspond à celle recommandée par Cos *et al.* (100 µg/ml) afin de rationaliser la présentation des résultats obtenus dans le cadre de l'évaluation d'une activité anti-infectieuse de produits bioactifs (Cos *et al.*, 2006). Certains auteurs sont cependant moins restrictifs, des extraits étant même considérés comme actifs pour des valeurs de CIM inférieures ou égales à 1000 µg/ml (Svetaz *et al.*, 2010).

Il faut noter que la valeur de la CIM dépend de nombreux facteurs : virulence de la souche, quantité d'inoculum, composition et pH du milieu, température et durée d'incubation, ainsi que du solvant dans lequel le produit est dilué (Martinez-Rossi et Peres, 2008). Afin d'obtenir les résultats les plus reproductibles d'une part, et les plus comparables à ceux de la littérature d'autre part, les tests de microdilution ont été réalisés en suivant les recommandations du CLSI (Clinical and Laboratory Standards Institute, ex-NCCLS, voir Matériel et Méthodes). Les résultats ont systématiquement été lus au bout de 2 jours d'incubation pour les levures et 5 jours d'incubation pour les champignons filamenteux afin de garantir au mieux la reproductibilité des résultats. Certains auteurs soulignent en effet que pour certaines souches, la date de lecture de la CIM peut avoir une forte influence sur le résultat obtenu (White *et al.*, 1998). Une étude suggère qu'une lecture de la CIM pour le fluconazole au bout de 24 h au lieu de 48 h, et à 50 % d'inhibition de la croissance au lieu des 80 % recommandés par les normes du CLSI, permettrait, dans le cas de certaines souches de *Candida*, d'obtenir une meilleure corrélation entre les valeurs de CIM relevées *in vitro* et l'effet *in vivo* des molécules azolées sur modèle murin (Rex *et al.*, 1998). Cependant, une étude récente menée sur l'efficacité d'antifongiques azolés sur *Aspergillus fumigatus* aboutit à la conclusion que, dans le cas de cette espèce, les CIM lues au bout de 24 heures ne sont pas suffisamment fiables et qu'un temps d'incubation de 48 heures reste nécessaire à une bonne reproductibilité des résultats (Rodriguez-Tuleda *et al.*, 2007). De même, il a été démontré que les valeurs de CIM obtenues à partir d'inocula réalisés à partir de fragments d'hyphes (morceaux de filaments), peuvent être notablement plus élevées que dans le cas d'inocula préparés à partir des conidies, c'est-à-dire des spores issues des filaments (Martinez-Rossi et Peres, 2008). Cependant, la comparaison des valeurs de CIM obtenues au laboratoire (inocula préparés à partir d'une solution de fragments de filaments passés au vortex) avec celles données dans les normes du CLSI montre que les ordres de grandeurs obtenus sont tout à fait cohérents.

Tableau 15 : Concentrations inhibitrices minimales (CIM en µg/ml) pour les deux lots d'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* et pour les molécules majoritaires de ces huiles. Les valeurs inférieures ou égales à 125 µg/ml (valeur limite d'activité) sont indiquées en gras. Les valeurs indiquées sont des valeurs arrondies au chiffre entier. Dernière ligne : cytotoxicité sur cellules VERO (CI₅₀ en µg/ml) pour le lot 2 d'huile essentielle d'*Otacanthus azureus*.

Produit	Levures ^a						Filamenteux ^a				
	<i>C. a.</i> ATCC 10231	<i>C. a.</i> LMGO 102	<i>C. p.</i> ATCC 22019	<i>C. p.</i> LMGO 05	<i>C. t.</i> LMGO 25	<i>C. k.</i> LMGO 174	<i>T. t.</i> LMGO 45	<i>T. r.</i> LMGO 6	<i>T. m.</i> LMGO 1931	<i>M. g.</i> LMGO 10	<i>M. c.</i> LMGO 22
<i>Otacanthus azureus</i> ^b (lot 1)	> 500	> 500	> 500	500	500	500	62	8	62	31	> 500
<i>Otacanthus azureus</i> ^b (lot 2)	250	250	125	125	125	> 500	62	4	31	31	> 500
β-copaën-4-α-ol	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	16	32	> 64	64	> 64
α-humulène	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	31	64	> 64	> 64	> 64
α-copaène	64	16	32	32	32	> 64	16	4	> 64	64	> 64
myrténal	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	64	32	> 64	> 64	> 64
F12 (38% β-copaën-4- α-ol, 23 % viridiflorol)	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	32	32	> 64	> 64	> 64
trans-pinocarvéol	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	64	> 64	> 64	> 64
α-pinène	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	16	> 64	> 64	> 64
β-pinène	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	> 64	64	> 64	> 64	> 64
Itraconazole	0,25	0,5	0,25	0,5	0,25	> 16	0,25	2	0,5	0,5	4
Fluconazole	2	1	2	2	1	> 64	n.t. ^c	n.t.	n.t.	n.t.	n.t.
<i>Otacanthus azureus</i> ^b (lot 2)	VERO (CI ₅₀ , µg/ml)	> 100									

^a *C. a.* = *Candida albicans*, *C. p.* = *Candida parapsilosis*, *C. t.* = *Candida tropicalis*, *C. k.* = *Candida krusei*, *T. t.* = *Trichophyton tonsurans*, *T. r.* = *Trichophyton rubrum*, *T. m.* = *Trichophyton mentagrophytes*, *M. g.* = *Microsporum gypseum*, *M. c.* = *Microsporum canis*

^b HE = huile essentielle

^c n.t. = non testé

Les résultats obtenus montrent que le lot 2 d'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* est globalement plus actif que le lot 1. Le lot 2 est le seul à présenter une activité inhibitrice de la croissance des souches de levures testées, mais les valeurs relevées sont de 125 µg/ml pour *Candida parapsilosis* et *Candida tropicalis*, soit la limite fixée pour considérer une huile comme active. Le lot 2 est de plus légèrement plus actif que le lot 1 dans le cas de *Trichophyton rubrum* et *Trichophyton mentagrophytes* (4 et 31 µg/ml respectivement contre 8 et 62 µg/ml pour le lot 1), les valeurs obtenues démontrant cependant dans les deux cas une activité de l'huile brute très satisfaisante. Le résultat obtenu sur *T. rubrum* est particulièrement intéressant, car très proche de la valeur obtenue pour l'itraconazole, antifongique de référence (2 µg/ml), alors même qu'il s'agit d'un mélange complexe. Des CIM similaires ont été relevées pour les deux lots sur *T. tonsurans*, *M. gypseum* et *M. canis*, avec des activités modérées dans les deux premiers cas, mais aucune activité sur la dernière souche.

Il apparaît ainsi que la composition de l'huile obtenue pour le lot 2 lui confère de meilleures propriétés antifongiques. En première approche, il semblerait donc qu'une proportion plus importante de sesquiterpènes, en particulier oxygénés, puisse être liée à cette activité, alors qu'une plus forte proportion de monoterpènes hydrocarbonés irait dans le sens d'une diminution de l'activité antifongique, plus particulièrement dans le cas des levures de type *Candida*. Dans le cas des monoterpènes, il a en effet été démontré l'importance de la présence d'un groupement phénol pour l'activité de ces composés : rôle du carvacrol comparativement à l' α -terpinène et au *p*-cymène, totalement inactifs, dans l'activité antimicrobienne d'huiles essentielles d'*Origanum* sp. (Aligiannis *et al.*, 2001), relation entre la présence de thymol et de carvacrol et l'activité antifongique de l'huile essentielle de *Thymus pulegioides*, avec encore une fois des valeurs de CIM élevées pour l' α -terpinène et le *p*-cymène (Pinto *et al.*, 2006), importance du cinéole et de l' α -terpinéol dans l'activité antifongique, en particulier sur *Candida* sp., de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* par rapport au terpinolène, à l' α -terpinène et au γ -terpinène (Oliva *et al.*, 2003). Le cas particulier du linalol a également été étudié, permettant possiblement d'élargir cette règle à la présence d'un groupement hydroxyle, que la structure soit cyclique ou acyclique (Hammer *et al.*, 2003; Khan *et al.*, 2010). En ce qui concerne les monoterpènes hydrocarbonés, l' α - et le β -pinène, seuls monoterpènes testés ici, n'ont effectivement montré aucune activité sur les levures, ce qui est cohérent avec des CIM relevées dans la littérature (310 µg/ml pour le β -pinène sur *C. albicans* ATCC 14053 (Maggi *et al.*, 2009), 156 et 625 µg/ml pour l' α - et le β -pinène respectivement sur *C. albicans* ATCC 90028 (Owolabi *et al.*, 2010)). L'isomère α est cependant modérément actif sur *T. rubrum*, plus que l'isomère β , ce qui contredit dans ce cas la règle énoncée par Dorman & Deans (2000) (voir paragraphe A. Terpènes et huiles essentielles). Des activités très importantes, aussi bien sur les levures que sur les dermatophytes, ont également été relevées par certains auteurs (Hammer *et al.*, 2003). Les résultats sur ce point semblent donc dépendre fortement des souches testées et des essais effectués.

Concernant les données de la littérature, peu de références ont été trouvées donnant les CIM de sesquiterpènes purs sur des espèces de champignons étudiées ici, sauf par exemple une valeur de 625 µg/ml pour le germacrène D sur *C. albicans* ATCC 90028 (Owolabi *et al.*, 2010) et des CIM de 155 et 78 µg/ml pour le (E)-caryophyllène et l'oxyde de caryophyllène sur *C. albicans* ATCC 14053 (Maggi *et al.*, 2009). Ces composés sont présents respectivement à hauteur de 0,03, 0,52 et 0,56 % dans l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus*. L'activité antifongique du viridiflorol a été évaluée sur des souches de champignons phytopathogènes, mais celle-ci s'est révélée faible (Scher *et al.*, 2004). L' α -humulène quant à lui a en particulier été testé sur des levures, dont *Candida sake*, sans montrer d'activité antifongique (Nissen *et al.*, 2010). Des huiles composées majoritairement de sesquiterpènes oxygénés possèdent cependant de bonnes activités antifongiques, comme l'huile essentielle de *Plinia cerrocampanensis*, constituée en particulier d' α -bisabolol (42,8 %), d'oxyde de bisabolol (10,3 %) et de *trans*-nérolidol (9,4 %), et testées sur des levures du genre *Candida* (CIM > 250 µg/ml) et sur des champignons dermatophytes (*T. mentagrophytes* : CIM 31 µg/ml, *T. rubrum* : CIM 62,5 µg/ml, *M. gypseum* : CIM 125 µg/ml) (Vila *et al.*, 2010).

Afin d'obtenir plus d'éléments sur le lien entre composition de l'huile et activité antifongique, les molécules les plus présentes dans les deux lots d'huile ont donc été testées. Les isomères du pinène, représentés en quantité plus importante dans le lot 1 que dans le lot 2, ont également été inclus dans cet essai.

Sur les espèces de *Candida* testées, seul l' α -copaène a démontré une activité antifongique, avec en particulier une CIM de 16 µg/ml (soit 78 µM) dans le cas de l'isolat clinique de *C. albicans*. Des valeurs de 31 µg/ml (156 µM) ont été mesurées pour *C. parapsilosis* et *C. tonsurans*. L' α -copaène étant présent en quantité plus importante dans le lot 2 que dans le lot 1 (6,6 % dans le lot 1, 8,8 % dans le lot 2), l'activité de cette molécule pourrait expliquer les meilleurs résultats observés sur ces souches par l'huile essentielle obtenue en mars 2008 (lot 2). Cependant la présence et l'activité de l' α -copaène ne suffisent apparemment pas à expliquer complètement l'ordre des activités de l'huile sur les différentes souches de *Candida* testées (*C.p.* et *C.t.* > *C.a.* LMGO 102, en particulier), les valeurs numériques d'activité n'étant pas directement corrélées entre l'huile et la molécule pure. Certains auteurs postulant qu'une différence de CIM inférieure ou égale à deux ordres de dilution n'est pas considérée comme significative (Baixench *et al.*, 2007), l' α -copaène pourrait malgré tout être considéré comme fortement lié à l'activité anti-*Candida* de l'huile essentielle d'*Otacanthus caeruleus*.

Dans le cas des champignons filamenteux, les deux lots d'huile tout comme les molécules pures testées présentent des valeurs de CIM plus faibles c'est-à-dire une activité plus marquée. Le fait que l'huile essentielle, ainsi éventuellement que ses composants majoritaires, soient plus actifs sur les

champignons dermatophytes que sur les levures a également été mis en évidence par plusieurs auteurs (Hammer *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2010).

Concernant les composés testés, l' α -copaène reste la molécule la plus active, avec en particulier des CIM de 16 $\mu\text{g/ml}$ (78 μM) sur *T. tonsurans* et 4 $\mu\text{g/ml}$ (19,5 μM) sur *T. rubrum*. Même s'il reste difficile d'attribuer l'activité d'un mélange complexe à une unique molécule, l'activité de l'huile sur ces deux souches peut donc raisonnablement être corrélée à la présence de ce composé. Pour les deux espèces de *Trichophyton* précédemment citées, les autres molécules testées, y compris les pinènes, ont presque toutes présenté une activité plus ou moins marquée sur ces souches, les meilleurs résultats étant obtenus pour le β -copaène-4- α -ol sur les deux souches (CIM de 16 et 31 $\mu\text{g/ml}$ respectivement, soit 72 et 144 μM), l' α -humulène sur *T. tonsurans* (31 $\mu\text{g/ml}$, soit 156 μM), et le myrténal et l' α -pinène sur *T. rubrum* (respectivement 31 et 16 $\mu\text{g/ml}$, soient 213 et 118 μM), ces valeurs restant cependant élevées et témoignant donc d'une activité modérée à faible. Dans le cas de *M. canis*, l'huile est inactive et aucune des molécules testées n'a présenté d'activité antifongique sur ce champignon dans notre essai.

Dans le cas des deux dernières souches, *T. mentagrophytes* et *M. gypseum*, la situation est plus complexe : dans le premier cas aucune des molécules testées n'a présenté d'activité, alors que les deux lots d'huile sont actifs sur cette souche, et dans le second cas seul l' α -copaène est actif, mais sa CIM est plus élevée que celle de l'huile brute, l'activité de celle-ci n'étant donc pas expliquée seulement par la présence de cette molécule. Ces deux résultats plaident donc en faveur de l'existence de phénomènes de synergie expliquant les propriétés biologiques observées pour l'huile essentielle d'*Otanthus azureus* pour ces deux souches. Selon Bakkali *et al.* (Bakkali *et al.*, 2008), les huiles essentielles peuvent être caractérisées par deux ou trois molécules principales représentant la majeure partie de l'huile (de 20 à 70 %), ces composés déterminant généralement les propriétés biologiques de l'huile essentielle. Ce cas de figure n'est cependant pas systématiquement vérifié, des phénomènes de synergie entre les nombreux composés de l'huile pouvant intervenir dans l'activité biologique démontrée. Ce phénomène de synergie entre des constituants d'une huile essentielle antifongique a par exemple été décrit, dans le cas d'huiles essentielles de *Thymus* sp., entre le thymol et le cinéole, le thymol et le *p*-cymène, ainsi qu'entre le carvacrol et le cinéole et le carvacrol et le *p*-cymène (Pina-Vaz *et al.*, 2004). Des phénomènes de synergie et d'antagonisme entre les différents constituants de l'huile essentielle de menthe (menthone, carvone et pulgénone) ont également été mis en évidence dans le cadre de l'évaluation de son activité insecticide et génotoxique (Franzios *et al.*, 1997). De même, l'effet inhibiteur de l'acétylcholinestérase de l'huile de sauge (*Salvia lavandulaefolia*) est également lié à des effets synergiques (1,8-cinéole / α -terpinène, 1,8-cinéole / oxyde de caryophyllène) ou antagonistes (1,8-cinéole / camphre) observés entre ses constituants suivant leur concentration (Savelev *et al.*, 2003).

Dans le cadre d'un approfondissement de cette étude, il serait donc intéressant d'effectuer ce type d'essai sur les molécules majoritaires de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* dans un premier temps, mais également en incluant des composés minoritaires dans un second temps si besoin. Certains monoterpènes possédant un groupement phénolique, structure connue pour son influence sur l'activité antifongique des molécules, pourraient par exemple jouer un rôle dans l'activité observée ici. Dans le cas de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus*, ce type de molécules, de la famille des menthanes, n'est représenté que par des composés minoritaires tels que les *para*-mentha-2,8-dièn-1-ol (isomère *trans* : 0,25 % dans le lot 2, isomère *cis* : 0,12 %), le terpinèn-4-ol (à hauteur de 0,6 % dans le lot 2) et un isomère du menthadiénol (0,2 % de cette molécule dans le lot 2). Il est cependant possible que ces composés puissent avoir un effet sur l'activité antifongique de l'huile. Le seul essai de mélange de composés effectué ici l'a été du fait du fractionnement sur colonne de silice réalisé en amont et ayant abouti à une fraction contenant un mélange de viridiflorol (23 %), de β -copaèn-4- α -ol (38 %) et d'autres composés minoritaires. Ce mélange est soit autant soit moins actif que le β -copaèn-4- α -ol (on relève par exemple une CIM de 16 μ g/ml pour la molécule pure sur *T. tonsurans*, contre 32 μ g/ml pour le mélange), mais il est difficile de tirer plus de conclusions du fait des 39 % de composés autres que ces deux molécules.

Les relations entre composition et activité seront discutées d'un point de vue plus global lors du traitement statistique des résultats obtenus pour un lot d'huiles essentielles testées pour leur activité antifongique (Chapitre 3, point 2.).

En complément de l'étude de l'activité antifongique de l'huile essentielle et de ses constituants, une évaluation de la cytotoxicité du lot 2 (le plus actif) a été effectuée sur cellules VERO (lignée épithéliale de rein de singe vert). La valeur de CI_{50} obtenue, supérieure à 100 μ g/ml, montre que l'huile essentielle n'est pas toxique sur cette lignée cellulaire. Elle possède donc un potentiel intéressant pour une valorisation thérapeutique.

7. Activité antifongique de l'huile essentielle d'*O. azureus* combinée avec des antifongiques azolés (itraconazole, fluconazole, cétoconazole)

Les études de combinaisons de substances médicinales en général, et antifongiques en particulier, sont de plus en plus souvent décrites dans la littérature (Jansen *et al.*, 2009). Cette stratégie est en effet d'un grand intérêt en vue de potentielles applications cliniques, car permettant de réduire les éventuels effets secondaires des traitements actuels en diminuant la dose de composé utilisé (Rosato *et al.*, 2007), limitant ainsi également le développement des phénomènes de résistance (Rosato *et al.*, 2008). Cette approche permettrait également de diminuer la quantité d'huile essentielle nécessaire à l'obtention d'une activité antifongique – ce type de produits étant souvent connu pour le

fait de devoir être utilisés à des concentrations relativement élevées - et de contourner le problème de leur faible absorption au niveau intestinal, qui limite habituellement leurs applications en ce qui concerne le traitement des mycoses systémiques (Rosato *et al.*, 2007; Shin et Lim, 2004). Ce type d'étude a de plus déjà prouvé son efficacité en montrant une bonne corrélation entre les synergies mise en évidence *in vitro* et les résultats cliniques obtenus dans le cas du traitement de certaines infections bactériennes (White *et al.*, 1996).

Dans cette optique, l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* a été testée en combinaison (dilution séries croisées, ou « checkerboard ») avec successivement 3 antifongiques azolés : l'itraconazole, le fluconazole et le cétoconazole, sur 3 souches de *Candida* (*C. albicans* LMGO 102, *C. parapsilosis* ATCC 22019 et *C. parapsilosis* LMGO 05) ainsi que sur deux souches de champignons filamenteux : *T. mentagrophytes* LMGO 1931 et *M. gypseum* LMGO 10).

Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau suivant (*Tableau 16*). Les concentrations inhibitrices fractionnées (CIF) sont calculées en divisant la CIM de la combinaison des deux produits par la CIM des produits testés individuellement. L'ICIF (indice de CIF), obtenu par addition des deux valeurs de CIF, est interprété comme suit (Puyn et Shin, 2006; Shin et Lim, 2004):

- ICIF > 2 : association antagoniste
- $0,5 < \text{ICIF} \leq 2$: association additive ou indifférente
- $\text{ICIF} \leq 0,5$: association synergique

Ce choix est arbitraire car les valeurs limites trouvées dans la littérature sont parfois différentes (antagonisme si l'indice est supérieur à 4 (White *et al.*, 1996), supérieur à 1 (Rosato *et al.*, 2007), synergie si l'indice est inférieur à 1 plutôt que inférieur ou égal à 0,5 (Ringwald *et al.*, 1999) mais permet d'assez bien discriminer les résultats obtenus.

Tableau 16 : Concentration inhibitrices minimales (CIM, µg/ml), concentrations inhibitrices fractionnées et indice de CIF pour des combinaisons d'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* et d'antifongiques azolés. Les valeurs d'ICIF ≤ 0,5 sont indiquées en gras (synergie).

Produit / Résultats ^c	Levures ^a												Filamenteux ^a							
	<i>C. a.</i> LMGO 102				<i>C. p.</i> ATCC 22019				<i>C. p.</i> LMGO 05				<i>T. m.</i> LMGO 1931				<i>M. g.</i> LMGO 10			
	CIM _s	CIM _c	CIF	ICIF	CIM _s	CIM _c	CIF	ICIF	CIM _s	CIM _c	CIF	ICIF	CIM _s	CIM _c	CIF	ICIF	CIM _s	CIM _c	CIF	ICIF
<i>Otacanthus azureus</i> - itraconazole																				
HE ^b <i>Otacanthus azureus</i>	500	16	0,03	0,3	125	31	0,25	0,4	250	62	0,25	0,4	62	8	0,13	0,4	31	16	0,52	0,6
Itraconazole	0,125	0,03	0,24		0,25	0,03	0,12		0,25	0,03	0,12		0,5	0,125	0,25		0,5	0,03	0,06	
<i>Otacanthus azureus</i> - fluconazole																				
HE ^b <i>Otacanthus azureus</i>	500	4	0,01	4,0	125	4	0,03	2,0	250	4	0,02	2,0	62	31	0,50	0,5	31	16	0,52	0,6
Fluconazole	0,25	1	4		2	4	2		8	16	2		8	0,25	0,03		8	1	0,13	
<i>Otacanthus azureus</i> - cétoconazole																				
HE ^b <i>Otacanthus azureus</i>	500	62	0,12	0,1	125	16	0,13	0,2	250	31	0,12	0,2	62	16	0,26	0,5	31	16	0,516	0,8
Cétoconazole	16	0,03	0,002		0,5	0,03	0,06		0,5	0,03	0,06		1	0,25	0,25		2	0,5	0,25	

^a *C. a.* = *Candida albicans*, *C. p.* = *Candida parapsilosis*, *M. g.* = *Microsporium gypseum*, *T. m.* = *Trichophyton mentagrophytes*

^b HE = huile essentielle

^c CIM_s : CIM du produit seul, CIM_c : CIM du produit pour la combinaison la plus active, CIF: concentration inhibitrice fractionnée (ou partielle), ICIF: indice de CIF

Les résultats obtenus sont également analysés selon la méthode des isobogrammes (*Figure 52*): les CIM ($\mu\text{g/ml}$) de chaque combinaison entre les deux produits (antifongique commercial et huile essentielle) sont calculées et tracées graphiquement afin de déterminer l'effet de la combinaison (additivité, synergie, antagonisme). Si un phénomène de synergie est mis en évidence, la courbe aura un aspect concave et un effet antagoniste conduira à une courbe convexe (Williamson, 2001).

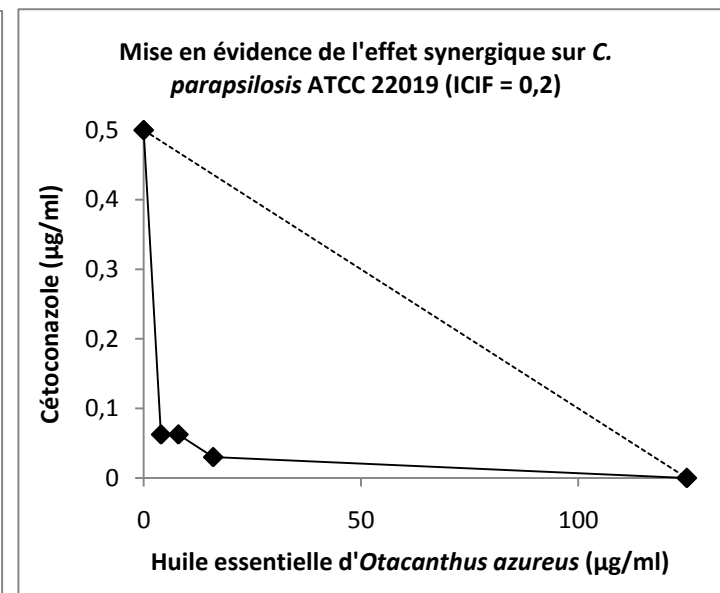
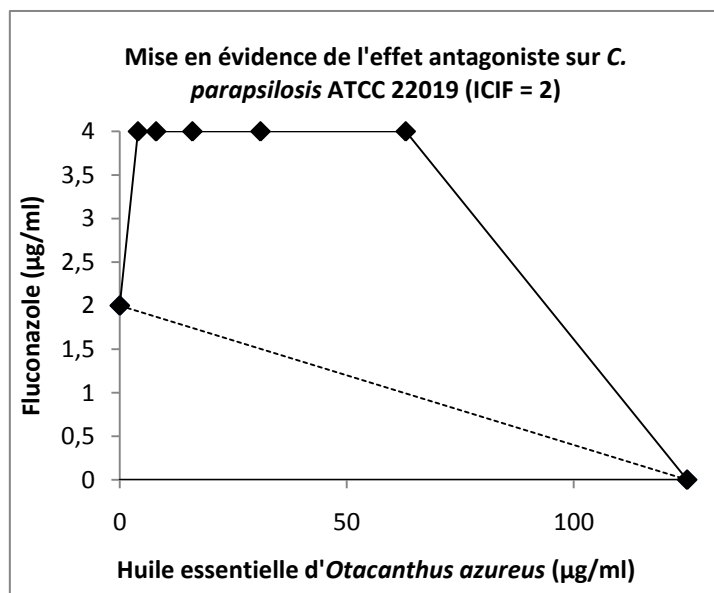
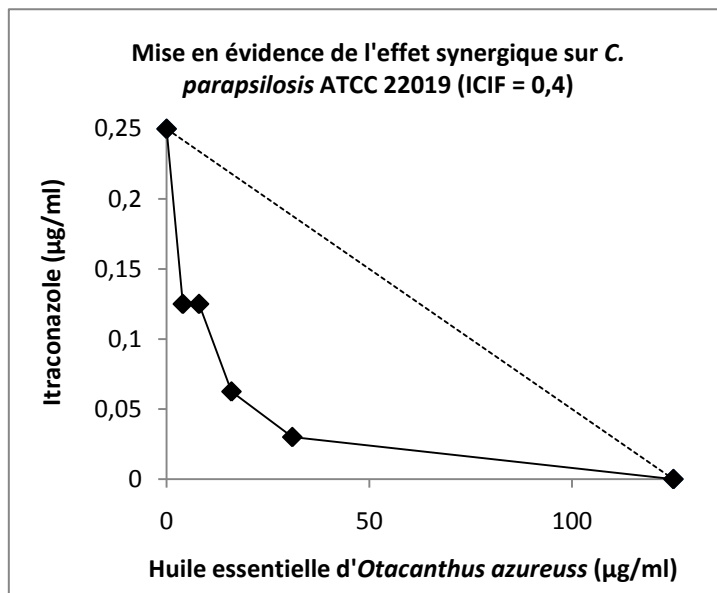
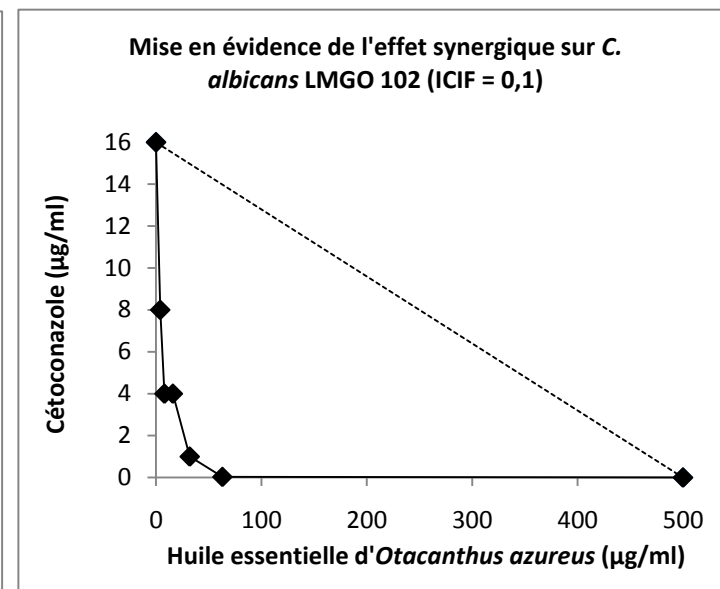
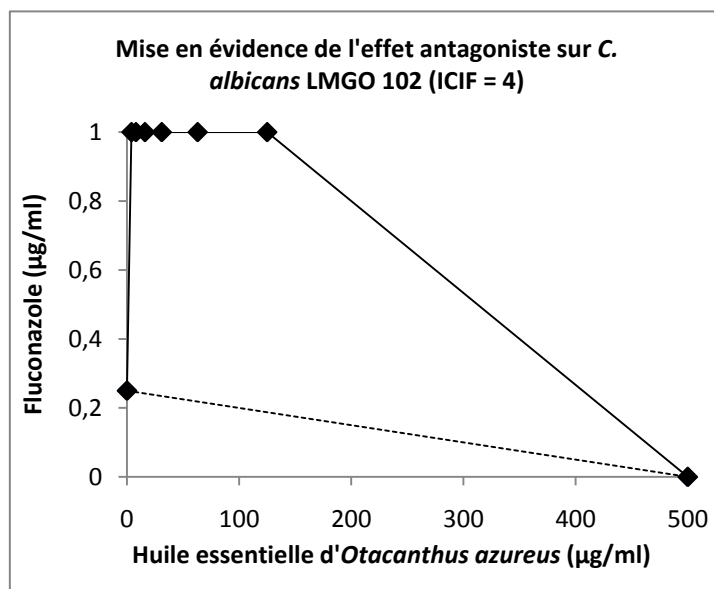
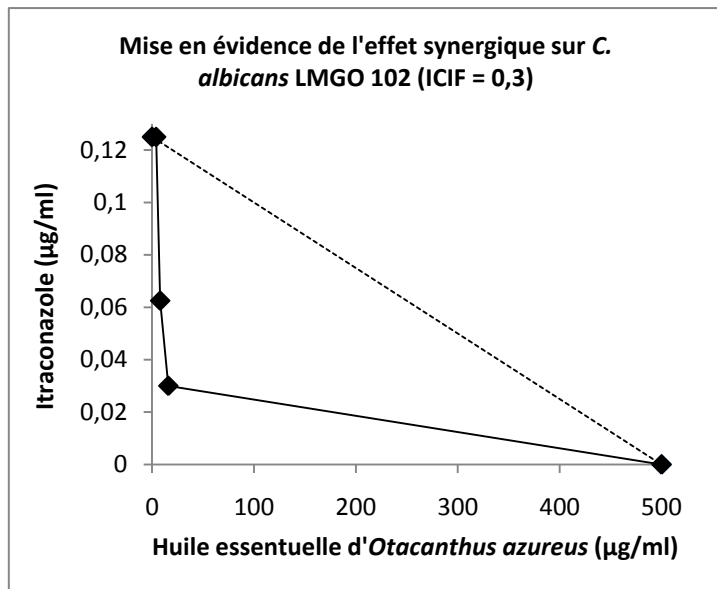
De façon générale, ces résultats mettent en évidence :

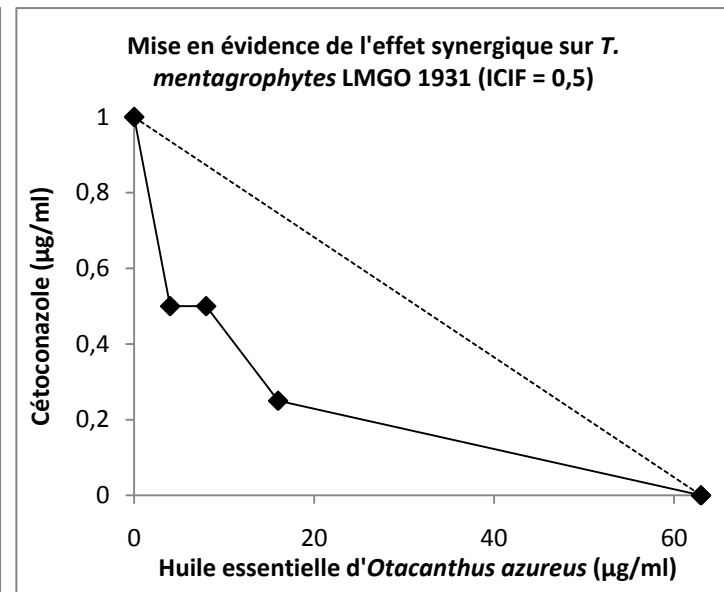
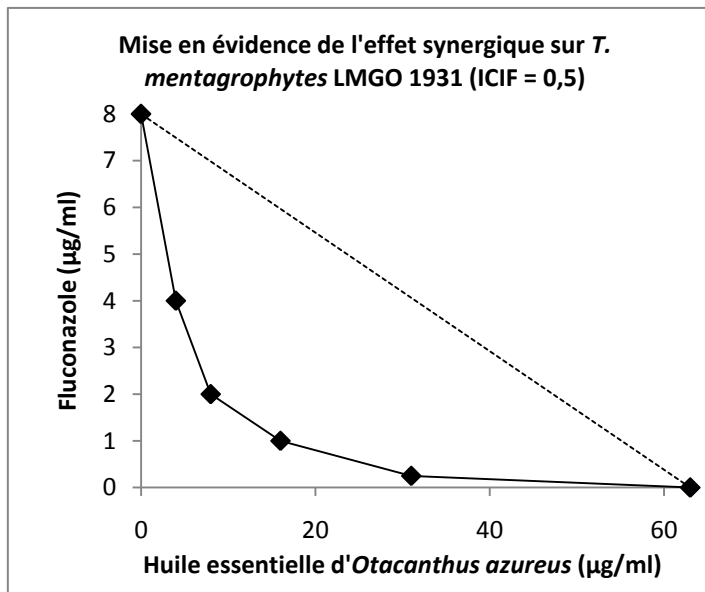
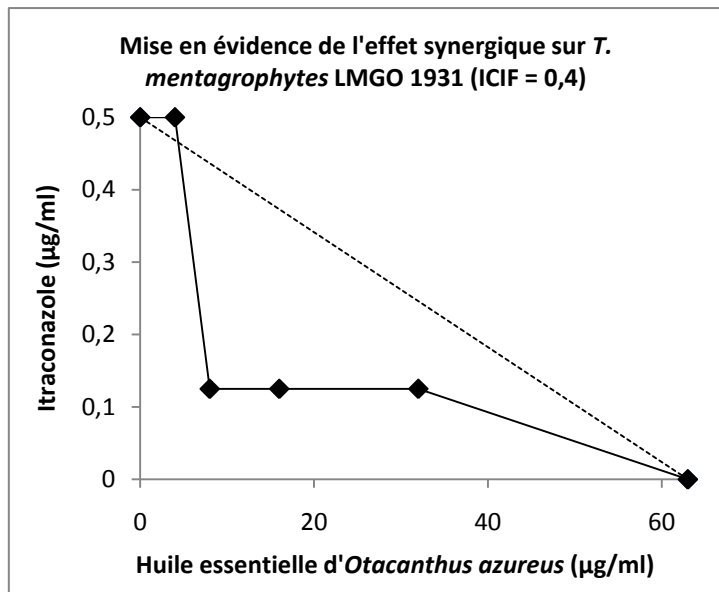
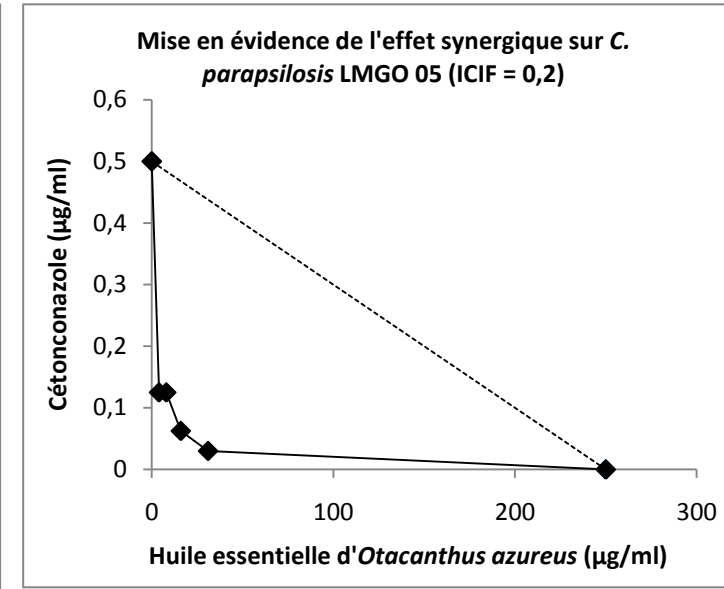
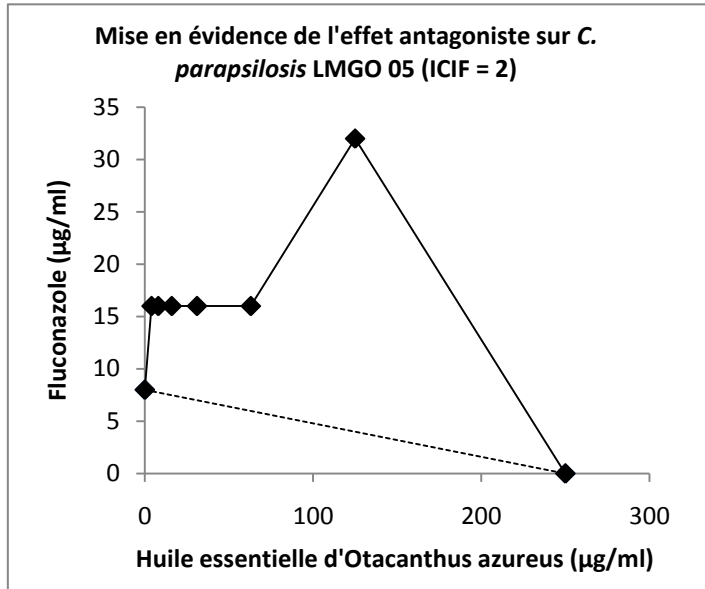
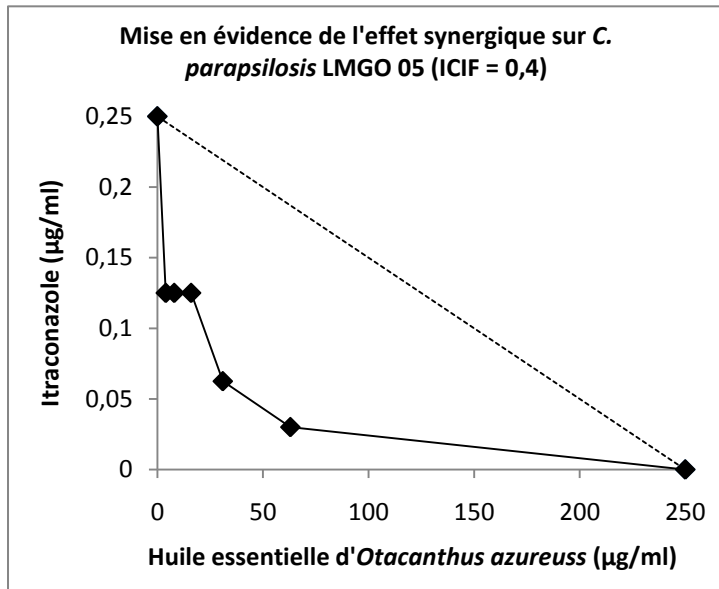
- Une action synergique entre l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* et les trois antifongiques azolés (itraconazole, fluconazole et cétoconazole) dans le cas des deux espèces de champignons dermatophytes testées,
- Une action synergique entre l'huile et l'itraconazole, et entre l'huile et le cétoconazole dans le cas des *Candida*,
- Une action antagoniste de l'huile sur le fluconazole dans le cas des *Candida*.

Dans le cas des synergies, la combinaison huile / antifongique est particulièrement efficace sur *Candida* sp. (ICIF de 0,1 à 0,4), surtout dans le cas du cétoconazole (ICIF de 0,1 et 0,2). Avec cette combinaison, les concentrations d'itraconazole et de cétoconazole nécessaires à l'inhibition de la croissance des souches sont donc très nettement réduites (CIM_c de 0,03), de même que la concentration en huile essentielle, alors que cette huile n'était que très légèrement active, voire inactive, lorsqu'utilisée seule. Pour les champignons filamenteux, les valeurs d'ICIF sont plus élevées (0,4 à 0,8). Dans le cas de *Microsporium gypseum*, elles sont même témoin d'un phénomène additif ou indifférent suivant le critère de classification choisi (Shin et Lim, 2004), mais les isobogrammes montrent bien un phénomène de synergie¹⁶. Cependant, dans le cas des champignons dermatophytes, si la concentration de l'huile nécessaire à une inhibition de croissance du micro-organisme n'est que peu diminuée, la concentration en antifongique est cependant nettement réduite dans tous les cas (CIF des antifongiques de 0,03 à 0,25). L'intérêt d'une combinaison de produits dans le but de diminuer les doses d'antifongiques pour en réduire les effets secondaires et diminuer le phénomène de développement des résistances est donc également pleinement conservé dans ce cas.

Les isobogrammes obtenus (*Figure 52*) confirment bien les résultats déduits des valeurs de CIF et d'ICIF.

¹⁶ Selon le critère de Ringwald *et al.* (1999), ces valeurs d'ICIF seraient effectivement classées dans celles correspondant à une synergie.





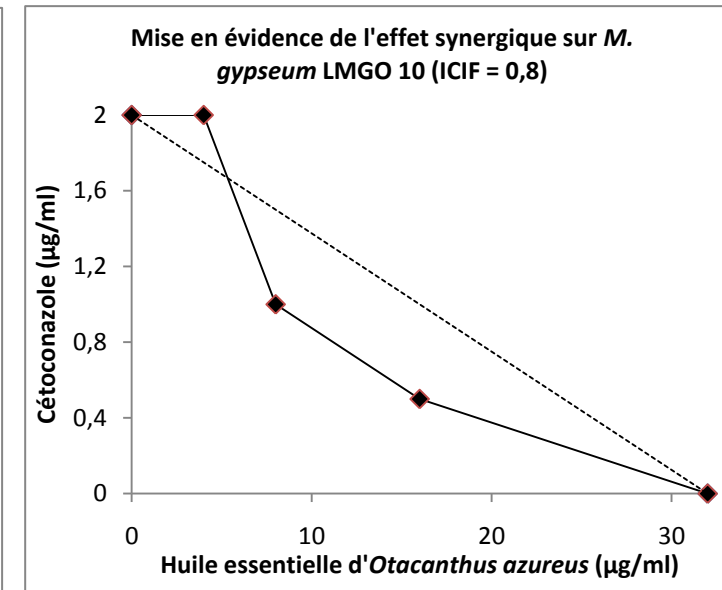
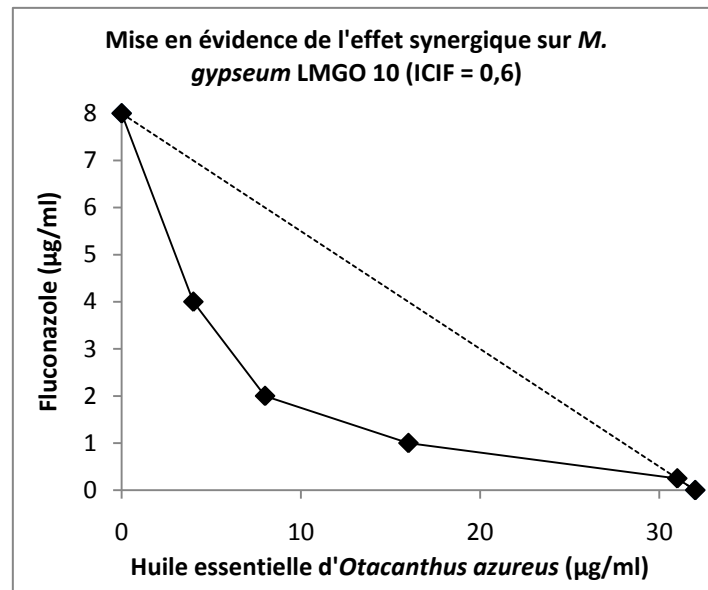
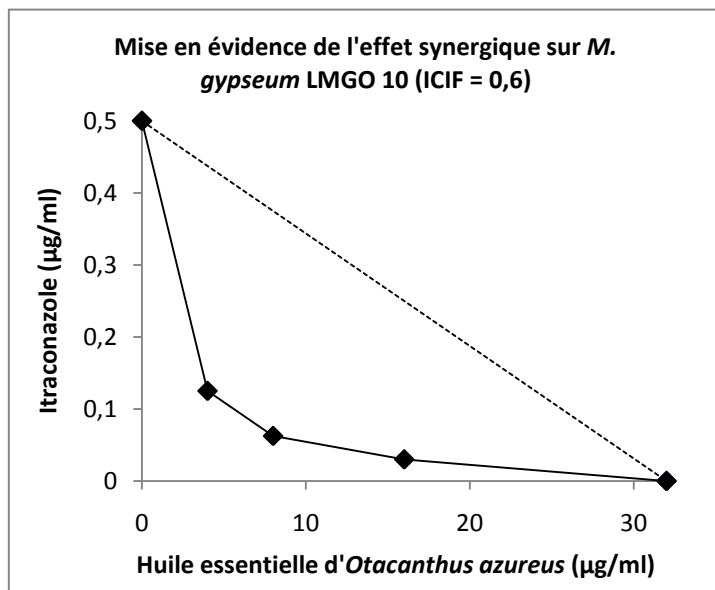


Figure 52 : Isobogrammes mettant en évidence les phénomènes de synergie ou d'antagonisme de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* en combinaison avec des antifongiques azolés (itraconazole, fluconazole, itraconazole) sur l'inhibition de la croissance de levures (*C. albicans*, *C. parapsilosis*) et de champignons dermatophytes (*T. mentagrophytes*, *M. gypseum*)

Il est intéressant de noter que le fluconazole possède un comportement différent en combinaison avec l'huile essentielle vis-à-vis de l'inhibition de la croissance des souches testées. En effet, des phénomènes de synergie, bien que plus ou moins marqués, ont été mis en évidence aussi bien sur les levures que sur les champignons dermatophytes dans le cas de l'itraconazole et du cétoconazole. Pour le fluconazole cependant, la synergie n'existe que dans le cas des champignons filamenteux, les essais réalisés sur les souches de *Candida* mettant en évidence un très net phénomène d'antagonisme (ICIF entre 2 et 4, CIF du fluconazole entre 2 et 4 également).

Du point de vue du mécanisme d'action de ces molécules ce résultat est plutôt surprenant, étant donné que l'itraconazole et le fluconazole ont été mis sur le marché plus récemment, avec notamment comme avantage des effets secondaires moindres par rapport au cétoconazole plus ancien, ces molécules se liant en effet moins fortement aux enzymes du cytochrome P450 (Elewski, 1998). La différence pourrait donc être à chercher plutôt du côté de la biologie des micro-organismes, même si ces trois molécules sont utilisées pour traiter aussi bien des infections à *Candida* que celles dues aux dermatophytes (Elewski, 1998; Jamieson, 2006). L'huile essentielle et ses mécanismes d'action propre rentrent sans doute également en ligne de compte de façon non négligeable. Shin et Lim ont par exemple mis en évidence des phénomènes de synergie pour des combinaisons entre l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens*, le géraniol et le citronellol, et le cétoconazole sur l'inhibition de la croissance de *Trichophyton soudanense* et *T. schoenleinii*, mais un effet additif dans le cas de *T. erinacei*, pourtant de la même espèce (Shin et Lim, 2004). Les auteurs n'ont pu expliquer cette différence d'effet, due selon eux aux mécanismes d'action non clairement identifiés des huiles essentielles sur les champignons. Rosato *et al.* aboutissent à la même conclusion après avoir observé un effet synergique entre l'huile essentielle de *Pelargonium graveolens* et un certain nombre de bactéries (*Bacillus cereus*, *Staphylococcus aureus*) et un effet additif ou indifférent pour *B. subtilis* et *Escherichia coli* (Rosato *et al.*, 2007). Dans le cas des synergies, il est en particulier possible que les terpènes de l'huile essentielle, du fait de leur forte lipophilie, agissent également en tant que solvant des molécules antifongiques commerciales, facilitant leur passage à travers les membranes cellulaires (Gershenson et Dudareva, 2007).

Cette étude pourrait être poursuivie en particulier en y incluant les autres souches testées sur lesquelles l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* a démontré une bonne activité antifongique (*C. tropicalis* LMGO 25, *T. tonsurans* LMGO 45 et *T. rubrum* LMGO 6 en particulier), ainsi que les molécules pures constituant l'huile (α -copaène et β -copaène-4- α -ol notamment) en combinaison avec les antifongiques. Enfin, cette étude a été limitée à l'emploi d'antifongiques azolés. Ces essais de combinaison pourraient donc être élargis à d'autres classes de traitements antifongiques. Des essais *in vivo* sur des champignons dermatophytes filamenteux par voie topique seraient également intéressants à mener, au vu des activités *in vitro* observées.

8. Conclusion sur l'étude de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* (Linden) Ronse

Dans le cadre de cette étude, deux lots d'huile essentielle de « fleur d'encens » (*O. azureus*) obtenus lors de deux récoltes différentes (mars 2007 et mars 2008) ont été étudiés d'un point de vue chimique et biologique. La composition chimique du second lot, qui s'est révélé être le plus actif des deux lors d'une évaluation de l'activité de l'huile essentielle sur l'inhibition de la croissance de levures et de champignons dermatophytes, a été déterminée précisément grâce au couplage de plusieurs techniques : GC/RI, GC/MS, et RMN. Cette détermination a permis d'identifier 86 composés représentant 94,8 % de l'huile, en majorité des sesquiterpènes oxygénés. Les molécules les plus abondantes dans l'huile sont le β -copaène-4- α -ol (23,3 %), l' α -humulène (10,6 %), l' α -copaène (8,8 %), le myrténal (5,6 %) et le viridiflorol (5,1 %). Ces résultats ont permis d'établir que cette composition était relativement proche de celle des huiles d'*O. azureus* décrites dans la littérature, le β -copaène-4- α -ol étant en particulier la molécule majoritaire dans tous les cas, même si les autres huiles décrites possèdent une proportion de monoterpènes plus élevée.

La faible différence de rendement pour les deux lots d'huile essentielle (0,04 % en mars 2007 et 0,03 % en mars 2008) et le fait que leurs compositions, bien que proches, ne sont cependant pas identiques (proportion de monoterpènes hydrogénés plus importante dans le lot 1) montrent la complexité de l'influence des facteurs environnementaux sur la production de composés volatils par les plantes.

L'évaluation de l'activité biologique des huiles a mis en évidence une activité modérée à inexistante sur les levures du genre *Candida* testées, mais des activités beaucoup plus intéressantes dans le cas des champignons dermatophytes, en particulier *T. rubrum*, pour lequel la valeur de CIM de l'huile brute (lot 2) n'est que deux fois supérieure à celle mesurée pour l'itraconazole. L'importance de la présence d' α -copaène pour l'activité de l'huile essentielle a été démontrée par la mesure de l'activité antifongique de cette molécule, même si des phénomènes de synergie sont a priori à prendre en compte pour rendre compte de l'activité de l'huile. Les essais de combinaison de l'huile et d'antifongiques azolés ont mis en évidence le fort potentiel de ce mélange complexe, du fait du grand nombre d'effets synergiques observés, en particulier sur les levures. L'association d'huile essentielle d'*O. azureus* avec les antifongiques azolés, en particulier l'itraconazole et le cétoconazole, pourrait donc permettre d'en diminuer les doses efficaces, minimisant ainsi les effets secondaires et limitant le développement de phénomènes de résistance. Des essais *in vivo*, aussi bien sur l'huile seule que sur les combinaisons de produits seront nécessaires afin de mieux cerner le potentiel de cette huile dans le cadre d'applications thérapeutiques. Cette étude met cependant en évidence l'intérêt de l'étude de mélanges complexes d'origine naturelle, en particulier les huiles essentielles.

D. Criblage d'huiles essentielles et analyse métabolomique : vers un outil de prévision de l'activité antifongique ?

1. Comparaison des résultats d'activité antifongique de 23 huiles essentielles issues de la flore guyanaise par les méthodes de diffusion en cavité et de microdilution

Vingt-trois huiles essentielles issues de 18 espèces différentes (13 familles) ont été testées sur des levures et des champignons dermatophytes filamenteux par la méthode de diffusion en cavité (ou perforation en agar) ainsi que par la méthode de microdilution décrite précédemment. Les résultats obtenus par les deux approches ont été comparés.

Les plantes récoltées ont été sélectionnées pour leur intérêt olfactif sur le terrain, présageant de l'obtention possible d'huile essentielle, certaines d'entre elles étant cependant bien connue pour la présence de cette huile. Elles appartiennent aux familles suivantes : Asteraceae (*Mikania micrantha* Kunth (Figure 53), *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski), *Unxia camphorata* L.f.), Boraginaceae (*Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult. (Figure 53)), Burseraceae (*Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand), Euphorbiaceae (*Croton nuntians* Croizat), Fabaceae (*Vouacapoua americana* Aubl.), Lauraceae (*Licaria canella* (Meisn.) Kosterm.), Myrtaceae (*Pimenta racemosa* (Mill.) Moore), Pinaceae (*Pinus caribaea* Morelet), Piperaceae (*Piper aduncum* L., *P. hispidum* Sw., *P. marginatum* Jacq.), Plantaginaceae (*Otacanthus azureus* (Linden) Ronse), Poaceae (*Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf), Scrophulariaceae (*Achetaria guianensis* Pennell (Figure 54)), Turneraceae (*Turnera odorata* Rich. (Figure 54) et Verbenaceae (*Lantana camara* L.).



Figure 53 : Fleurs de *Mikania micrantha* Kunth (à gauche) et *Cordia curassavica* (Jacq.) Roem. & Schult. (à droite)

La première évaluation de l'activité antifongique de ces huiles l'a été par la méthode de diffusion en cavité, ou perforation en agar. Les résultats obtenus sont présentés dans le tableau

suivant (*Tableau 17*). Les résultats obtenus par microdilution seront ensuite présentés. Les deux approches seront comparées d'un point de vue méthodologique, et les résultats obtenus discutés. Deux méthodes d'évaluation différentes ont été utilisées dans le but de savoir si le test de diffusion en cavité, plus rapide à effectuer que les microdilutions, pourrait être utilisé comme méthode préliminaire de sélection des huiles essentielles avant l'évaluation quantitative de leur activité antifongique par microdilution.

Le test de diffusion en cavité (ou de perforation en agar) est une méthode encore largement utilisée pour l'évaluation des propriétés antifongiques et antibactériennes de produits naturels, et en particulier des huiles essentielles (Fontenelle *et al.*, 2008; Govinden-Soulange *et al.*, 2004; Nantitanon *et al.*, 2007; Oke *et al.*, 2009). Des boîtes de Pétri sont préparées avec du milieu de culture (potato dextrose agar). Des cavités sont ensuite creusées dans le milieu de culture et les solutions de produits à tester sont placées dans ces cavités. Chaque suspension de champignon est déposée sur le milieu et étalée sur toute la surface. Dans ce type d'essais, les diamètres des zones d'inhibitions sont généralement mesurées après croissance homogène du champignon dans une boîte témoin, et les résultats numériques exploités. Une approche différente a été choisie ici : celle de présenter les résultats sous une forme qualitative, une zone d'inhibition de la croissance des champignons ou des levures mesurée conduisant à un + dans le tableau, et une absence d'inhibition conduisant à un -. Ce choix a été fait car ce type de protocole fait intervenir dans le résultat observé non seulement l'activité antifongique du produit testé, mais également le coefficient de diffusion des molécules considérées (Hammer *et al.*, 1999; Hood *et al.*, 2003; Rios *et al.*, 1988).



Figure 54 : *Achetaria guianensis* Pennell (à gauche) et *Turnera odorata* Rich. (à droite)

Tableau 17 : Interprétation qualitative des résultats obtenus pour les huiles essentielles sélectionnées (diamètres des zones d'inhibition de la croissance de levures et de champignons dermatophytes et de levures) pour le test de diffusion en cavité

Espèce	Organe ^b	Concentration (mg/ml)	Levures ^a		Filamenteux ^a		Rendement ^c (%)
			<i>C. k.</i> LMGO 174	<i>C. p.</i> LMGO 05	<i>T. m.</i> LMGO 1931	<i>M. c.</i> LMGO 22	
<i>Achetaria guianensis</i>	F+T	20	-	-	n.t.	-	0,03
<i>Cordia curassavica</i>	PA	20	-	-	n.t.	-	0,4
		100	+	-	+	-	
<i>Croton nuntians</i>	F	20	-	-	+	+	0,2
		100	-	-	+	+	
<i>Cymbopogon citratus</i> (lot 1)	F	20	+	+	+	+	0,3
<i>Cymbopogon citratus</i> (lot 2)	F	20	+	+	+	+	0,2
<i>Lantana camara</i>	PA	20	-	-	n.t.	-	0,1
<i>Licaria canella</i>	B	20	-	-	n.t.	+	-
	B	100	+	-	+	+	
	ES	20	+	-	n.t.	-	0,4
	ES	100	+	+	+	+	
	EF	20	+	-	+	-	-
<i>Mikania micrantha</i>	PA	20	+	+	-	-	0,06
<i>Otacanthus azureus</i> (lot 1)	PA	20	-	-	n.t.	+	0,04
		100	+	-	+	+	
<i>Otacanthus azureus</i> (lot 2)	PA	20	-	-	+	+	0,03
		100	+	+	+	+	
<i>Pimenta racemosa</i>	F	20	+	+	+	+	0,5
<i>Pinus caribaea</i>	F	20	-	-	n.t.	-	0,1
<i>Piper aduncum</i>	F	20	+	-	n.t.	+	0,7
		100	+	-	+	+	
<i>Piper hispidum</i>	F	20	-	-	n.t.	-	0,06
		100	+	+	+	+	
<i>Piper marginatum</i>	F	20	-	+	n.t.	-	0,3
		100	+	+	+	+	
<i>Protium heptaphyllum</i>	FRV	20	-	+	+	+	1,4
		100	+	+	+	+	
<i>Sphagnetica trilobata</i>	PA	20	+	-	-	+	0,1
<i>Turnera odorata</i>	PA	20	-	-	n.t.	-	0,1
		100	-	-	-	-	
<i>Unxia camphorata</i>	PA	20	-	-	n.t.	-	0,1
		100	-	-	+	+	
<i>Vouacapoua americana</i>	B	20	-	-	-	+	0,8

^a *C.k.* = *Candida krusei*, *C.p.* = *Candida parapsilosis*, *T.m.* = *Trichophyton mentagrophytes*, *M.c.* = *Microsporium canis* ; ^b F+T = feuilles + tiges, PA = parties aériennes (tiges, feuilles, fleurs), F = feuilles, FRV = fruits verts, B = bois (aubier+duramen), ES = écorce sèche, EF = écorce fraîche ; ^c par rapport au poids frais de matériel végétal distillé

Dans le tableau précédent (*Tableau 17*) les rendements obtenus pour chacune des huiles testées sont également indiqués (calculés par rapport au poids frais de matériel végétal distillé).

Les huiles mises en évidence comme les plus actives (inhibition de la croissance des quatres souches testées) après lecture des résultats obtenus sont les suivantes :

- *C. citratus* (parties aériennes, lots 1 et 2) à une concentration de 20 mg/ml
- *L. canella* (écorce sèche) à une concentration de 100 mg/ml
- *O. azureus* (parties aériennes, lot 2) à une concentration de 100 mg/ml
- *P. racemosa* (feuilles) à une concentration de 20 mg/ml
- *P. hispidum* (feuilles) à une concentration de 100 mg/ml
- *P. marginatum* (feuilles) à une concentration de 100 mg/ml
- *P. heptaphyllum* (fruits verts) à une concentration de 100 mg/ml

Selon ce critère, 8 huiles sur 22 soit 36 % des huiles testées suite à cette sélection au hasard peuvent donc être considérées comme très actives, à la fois sur les levures et sur les champignons dermatophytes. Pour les huiles d'activité antifongique moyenne, certaines inhibent à la fois la croissance des levures et des champignons dermatophytes (*C. curassavica*, *L. canella* (bois et écorce fraîche), *P. aduncum*, *S. trilobata*), alors que d'autres voient leur action limitée aux seuls dermatophytes (*C. nuntians*, *U. camphorata*, *V. americana*) ou plus exceptionnellement aux seules levures (*M. micrantha*). Le nombre d'huiles présentant au moins une activité antifongique dans le cadre de cet essai est donc de 18, soit 82 % des huiles testées. Les huiles présentant une activité sont généralement plus efficaces sur les champignons dermatophytes filamenteux que sur les levures en ce qui concerne les souches utilisées ici.

Certaines huiles se sont révélées totalement inactives sur les souches testées : *A. guianensis*, *L. camara*, *P. caribaea*, *T. odorata*.

Avant de poursuivre la discussion, les résultats obtenus par la méthode de microdilution sont présentés dans le tableau ci-dessous (*Tableau 18*) pour comparaison. Le nombre de souches utilisées a été augmenté, seul *C. krusei* n'a pu être testé à nouveau.

Tableau 18 : Concentrations inhibitrices minimales (CIM en µg/ml) pour les huiles essentielles testées. Les valeurs inférieures ou égales à 125 µg/ml (valeur limite d'activité) sont indiquées en gras

Espèce	Organe ^b	Levures ^a			Filamenteux ^a			Rendement ^c (%)
		<i>C. a.</i> LMGO 102	<i>C. p.</i> ATCC 22019	<i>C. p.</i> LMGO 05	<i>M. g.</i> LMGO 10	<i>T. m.</i> LMGO 1931	<i>M. c.</i> LMGO 22	
<i>Achetaria guianensis</i>	T+F	> 500	500	> 500	> 500	> 500	> 500	0,03
<i>Cordia curassavica</i>	PA	> 500	> 500	> 500	62	62	> 500	0,4
<i>Croton nuntians</i>	F	> 500	> 500	500	31	16	250	0,2
<i>Cymbopogon citratus</i> (lot 1)	F	250	125	125	16	8	62	0,3
<i>Cymbopogon citratus</i> (lot 2)		125	250	62	62	31	31	0,2
<i>Lantana camara</i>	PA	> 500	> 500	> 500	250/>500	125	> 500	0,1
<i>Licaria canella</i>	B	> 500	> 500	> 500	62	125	500	-
	ES	> 500	> 500	> 500	500	250	> 500	0,4
	EF	> 500	> 500	> 500	31	31	500	-
<i>Mikania micrantha</i>	PA	> 500	> 500	> 500	250	125	> 500	0,06
<i>Otacanthus azureus</i> (lot 1)	PA	> 500	> 500	> 500	125	125	500	0,04
<i>Otacanthus azureus</i> (lot 2)		250	125	125	16	8	125	0,03
<i>Pimenta racemosa</i>	F	500	500	250	62	62	125	0,5
<i>Pinus caribaea</i>	A	> 500	> 500	> 500	250	125	> 500	0,1
<i>Piper aduncum</i>	F	> 500	500	> 500	250	250	500	0,7
<i>Piper hispidum</i> (lot 1)	F	> 500	> 500	> 500	125	62	500	-
<i>Piper hispidum</i> (lot 2)		> 500	> 500	> 500	125	62	500	0,06
<i>Piper marginatum</i>	F	> 500	> 500	> 500	250	250	250	0,3
<i>Protium heptaphyllum</i>	FRV	125	62	125	62	31	62	1,4
<i>Sphagneticola trilobata</i>	PA	500	250	250	62	62	125	0,1
<i>Turnera odorata</i>	PA	> 500	> 500	> 500	500	125	> 500	0,1
<i>Unxia camphorata</i>	PA	500	> 500	> 500	500	250	> 500	0,1
<i>Vouacapoua americana</i>	B	> 500	> 500	> 500	62	62	500	0,8
Fluconazole		< 0,25	4	32	64	32	> 128	
Itraconazole		< 0,0625	0,25	0,25	0,25	< 0,0625	> 32	

^a *C.a.* = *Candida albicans*, *C.p.* = *Candida parapsilosis*, *M.g.* = *Microsporum gypseum*, *T.m.* = *Trichophyton mentagrophytes*, *M.c.* = *Microsporum canis* ; ^b F+T = feuilles + tiges, PA = parties aériennes (tiges, feuilles, fleurs), F = feuilles, A = aiguilles, FRV = fruits verts, B = bois (aubier+duramen), ES = écorce sèche, EF = écorce fraîche ; ^c par rapport au poids frais de matériel végétal distillé

A la lecture des résultats de ce test, certaines huiles essentielles se sont révélées particulièrement actives avec au moins cinq valeurs de CIM inférieures ou égales à 125 µg/ml sur les 6 souches sélectionnées :

- *C. citratus* (parties aériennes, lots 1 et 2) (Figure 55)
- *O. azureus* (parties aériennes, lot 2)
- *P. heptaphyllum* (fruits verts) (Figure 55)



Figure 55 : *Cymbopogon citratus* (DC.) Stapf. (à gauche) et fruits de *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (à droite)

Ces trois huiles essentielles, inhibant aussi bien la croissance des levures que des champignons dermatophytes filamenteux, étaient déjà mises en évidence comme très actives dans le cas du test de diffusion en cavité. Les valeurs de CIM obtenues pour ces huiles sont relativement faibles, avec en particulier une CIM de 16 µg/ml pour les huiles essentielles de *Cymbopogon citratus* (lot 1) et *Otacanthus azureus* (lot 2) sur *Microsporium gypseum*, et des CIM de 8 µg/ml pour ces deux mêmes huiles sur *Trichophyton mentagrophytes*.

Parmi les huiles ayant été mises en évidence comme très actives dans le cadre du premier test, *P. racemosa* confirme ce résultat avec une activité sur les trois souches de champignons dermatophytes testées. Les deux lots d'huile essentielle de *Piper hispidum* inhibent la croissance de *T. mentagrophytes* et *M. gypseum*, mais sont inactifs sur les levures. Enfin, pour les huiles essentielles de *L. canella* (écorce sèche) et *P. marginatum*, aucune activité n'a été relevée dans le test de microdilution, que ce soit sur les levures ou sur les champignons filamenteux. *Sphagneticola trilobata*, qui était active sur *C. krusei* et *M. canis*, inhibe ici la croissance des trois souches de champignons dermatophytes sélectionnées.

Les huiles d'activité antifongique moyenne inhibent dans le cadre de cette étude seulement la croissance des champignons filamenteux, seules les trois huiles présentées comme les plus actives ayant une action antifongique sur les levures.

Enfin, certaines huiles ont démontré une activité inexistante ou très faible (une seule CIM inférieure ou égale à 125 µg/ml), il s'agit de *A. guianensis*, *L. camara*, *M. micrantha*, *P. caribaea*, *P. aduncum*, *P. marginatum*, *T. odorata* et *U. camphorata*, c'est-à-dire celles déjà mises en évidence comme inactive dans le test de diffusion en cavité, plus *M. micrantha*, qui avait démontré une activité antifongique sur *C. krusei* et *C. parapsilosis*, et *U. camphorata*, inhibant la croissance de *T. mentagrophytes* et *M. gypseum*.

Discussion sur les résultats obtenus d'un point de vue méthodologique

Deux conclusions principales émergent de la comparaison des résultats obtenus par les deux méthodes sélectionnées :

- Le test de microdilution semble plus sélectif que le test de diffusion en cavité, avec seulement trois huiles (14 % des huiles sélectionnées) considérées comme très actives contre 8 dans le premier cas, et 15 huiles actives (plus d'une CIM inférieure ou égale à 125 µg/ml), soit 68 % des huiles sélectionnées. Ces résultats vont donc plutôt dans le sens contraire de ce qui pouvait être attendu du fait de l'influence du coefficient de diffusion sur les résultats du test de perforation en agar (Hood *et al.*, 2003).
- Les trois huiles considérées comme très actives inhibent à la fois la croissance des champignons filamenteux et celle des levures, alors que dans le test de diffusion en cavité, cet effet sur les deux types de champignons testés était visible à la fois pour les 8 huiles les plus actives et pour 6 autres huiles moyennement actives. Dans le cas de notre étude, les résultats obtenus sont donc opposés à ceux relevés dans le cadre de la thèse d'Alice Rodrigues, pour laquelle les extraits de bois testés étaient globalement plus actifs vis-à-vis des levures pathogènes dans le cadre des tests de microdilution (Rodrigues, 2010).

Plusieurs facteurs peuvent éclairer ces résultats. Le choix d'effectuer une analyse qualitative et non quantitative des résultats a été fait suite aux recommandations de certains auteurs (Hadacek et Greger, 2000; Hammer *et al.*, 1999; Nascimento *et al.*, 2007) du fait de l'influence des coefficients de diffusion dans le résultat. Ils conseillent donc de n'utiliser cette technique que pour établir la susceptibilité d'une souche aux produits testés. La méthode de diffusion en cavité serait donc dans certains cas trop sélective, plus particulièrement dans le cas des huiles essentielles, substances par définition composées de molécules hydrophobes et donc susceptible d'avoir une mauvaise diffusion dans l'agar, milieu majoritairement aqueux (Hood *et al.*, 2003; Rios *et al.*, 1988). Ce problème est en

particulier contourné dans la littérature et dans le cas de notre étude en réalisant des solutions-mères d'huiles essentielles dans des émulsifiants permettant ainsi une meilleure diffusion des molécules dans le milieu (Hood *et al.*, 2003; Nascimento *et al.*, 2007). La cohérence des résultats obtenus pour une même huile testée à deux concentrations différentes (meilleure activité à une concentration plus élevée) à la fois dans notre étude et dans la littérature (Fontenelle *et al.*, 2008; Nantitanon *et al.*, 2007) montre donc malgré tout qu'une certaine reproductibilité est possible.

De façon plutôt surprenante au vu de ces arguments, le test de diffusion en cavité réalisé ici est au contraire moins sélectif que le test de microdilution en ce qui concerne la sélection des huiles les plus actives. Des résultats de ce type ont cependant déjà été obtenus dans la littérature. Des absences de corrélation entre la valeur numérique de la zone d'inhibition de croissance et la concentration inhibitrice de croissance des micro-organismes ont par exemple été mises en évidence par certains auteurs, comme dans le cas des huiles essentielles de *Croton* (Fontenelle *et al.*, 2008). En effet, l'huile essentielle de *C. argyrophyllodes* conduit en fonction de la concentration à des zones d'inhibition de la croissance de *M. canis* de diamètre allant de 15 à 31 mm, avec une CIM de 9 à 19 µg/ml suivant les souches testées, alors que pour les mêmes concentrations l'huile essentielle de *C. zehntneri* inhibe la croissance des champignons sur des zones de diamètre allant de 12 à 22 mm – donc des valeurs proches – mais des valeurs de CIM de 620 à 1250 µg/ml. Selon nos critères (voir Chapitre 3.C. page 124) la seconde huile serait donc considérée comme inactive alors que le résultat du test est positif dans les deux cas pour le test de diffusion en cavité. Ce type de résultat a également été obtenu dans le cadre de l'étude des extraits et molécules issus de *Piper aduncum* sur des levures et bactéries, des zones d'inhibition importantes conduisant malgré tout à des valeurs de CIM ≥ 100 µg/ml et donc à un résultat négatif en microdilution (Okunade *et al.*, 1997). Il a également été mis en évidence par certains auteurs, par exemple dans le cas de l'huile essentielle de *Melaleuca alternifolia* (Hammer *et al.*, 2003), que certaines molécules ont la capacité d'interagir avec le plastique de la plaque 96 puits utilisée pour réaliser le test de microdilution. Ce phénomène pourrait donc conduire à parfois sous-évaluer l'activité antifongique d'une huile essentielle si ce type d'interaction est susceptible de se produire, les molécules étant alors moins disponibles en solution pour interagir avec les micro-organismes testés (Pina-Vaz *et al.*, 2004).

Dans un deuxième temps, il a également été remarqué que les huiles testées montraient une meilleure activité antifongique sur les levures pathogènes dans le cas de l'essai réalisé par la méthode de diffusion en cavité par rapport au test de microdilution, ce qui semble contradictoire par rapport aux résultats obtenus lors d'une autre étude réalisée dans le même laboratoire (Rodrigues, 2010). La conclusion de cette étude était ainsi que la méthode sur milieu gélosé est mal adaptée à l'évaluation des activités antifongiques avec certaines levures pathogènes. Ce phénomène pourrait en effet s'expliquer par la capacité pour les cellules des levures du genre *Candida* de s'associer pour former des biofilms (Miceli *et al.*, 2011), partiellement isolés du milieu de culture, limitant ainsi l'action

des produits diffusés dans le milieu. La contradiction apparente entre les résultats pourrait cependant être expliquée par la différence des produits testés : des extraits réalisés au méthanol et à l'acétate d'éthyle dans le cas des bois, donc relativement polaires comparés aux huiles essentielles évaluées ici, cette différence de comportement et de diffusion dans le milieu pouvant contribuer à des résultats différents, en dehors de la comparaison des activités intrinsèques des produits. Ce résultat reste cependant globalement cohérent par rapport aux données de la littérature, qui indiquent que les huiles essentielles testées en microdilution présentent fréquemment une meilleure activité sur les champignons dermatophytes que sur les levures (Hammer *et al.*, 2003; Pinto *et al.*, 2006; Tavares *et al.*, 2010).

En conclusion, les tests semblent donc globalement cohérents (les huiles les plus actives mises en évidence dans le test de microdilution font bien partie du groupe identifié suite au test de diffusion en cavité, et les huiles totalement inactives sont globalement communes aux deux tests). Le test de diffusion en cavité pourrait donc effectivement être utilisé en première approche comme indicateur de la susceptibilité d'une souche à un produit à tester, même si le nombre d'inhibitions de croissance obtenues sur les levures pathogènes est plus important que dans le cas du test de microdilution. Cependant, au vu des valeurs de CIM mesurées en microdilution, seules les trois huiles retenues par le biais de cette méthode présentent un réel potentiel de valorisation thérapeutique, les autres valeurs de CIM mesurées étant plus élevées. La sélectivité du test de microdilution semble donc adaptée aux critères de sélection retenus. De plus ce test permet d'obtenir directement des valeurs numériques fiables, nécessite de faibles quantités de produits et permet de comparer les données obtenues avec celles de la littérature du fait de sa normalisation, il semble donc au final le plus adapté à l'étude de l'activité antifongique des huiles essentielles.

Espèces identifiées comme ayant une huile essentielle possédant des activités antifongiques

Parmi les espèces identifiées comme très actives par les deux méthodes utilisées figurent *C. citratus* (citronnelle ou lemongrass), *O. azureus* (fleur d'encens) et *P. heptaphyllum* (encens), suivies de *P. racemosa* (bois d'Inde). Le cas d'*O. azureus* a été largement discuté au point C. de ce chapitre.

Huile essentielle de Cymbopogon citratus (citronnelle ou lemongrass)

L'huile essentielle de *C. citratus*, plante aromatique largement cultivée pour la production d'une huile essentielle riche en citral à destination de la parfumerie, la pharmacie, ainsi que les industries cosmétiques et agro-alimentaires (Irkin et Korukluoglu, 2009), est très largement citée dans la littérature pour son activité antifongique. Les résultats obtenus ici ne sont donc pas suprenants. Cette huile essentielle a en particulier démontré une excellente activité antifongique en inhibant la croissance (CIM < 125 µg/ml) de plusieurs espèces de *Trichophyton* (Shin et Lim, 2004). Une valeur de CIM obtenue sur *C. krusei* s'est cependant révélée plus élevée (de l'ordre de 300 µg/ml), ce qui

tendrait à confirmer nos résultats, c'est-à-dire une meilleure activité de l'huile sur les champignons dermatophytes filamenteux que sur les levures (Correa-Royero *et al.*, 2010). Cette huile a également été largement testée sur des champignons pathogènes intervenant dans la dégradation des récoltes ou des aliments, mettant en évidence son intérêt dans le contexte de la préservation de la qualité de ce type de produits (Mahanta *et al.*, 2007; Nguefack *et al.*, 2009; Tzortzakis et Economakis, 2007). Ses propriétés antibactériennes ont également été mises en évidence (Wannissorn *et al.*, 2005). Peu de déterminations de CIM ont cependant été effectuées, les méthodes de diffusion en agar restant encore fréquemment employées (Da Silva *et al.*, 2008; Irkin et Korukluoglu, 2009; Wannissorn *et al.*, 2005).

La composition de cette huile essentielle est fortement dominée par une proportion importante des isomères du citral, l' α -citral (géranial ou trans-citral) et le β -citral (néral ou cis-citral), malgré des variations suivant la diversité génétique et l'environnement (Mahanta *et al.*, 2007; Rauber *et al.*, 2007). Il a été montré que ces molécules sont en grande partie responsable de l'activité antifongique et antibactérienne de l'huile essentielle de *C. citratus*, en formant par transfert de charge un complexe avec un donneur d'électron de la membrane fongique, causant la mort de la cellule (Da Silva *et al.*, 2008; Onawunmi, 1989; Rauber *et al.*, 2007). L'analyse GC/MS des deux lots d'huile permet d'obtenir le résultat suivant (Figure 56) :

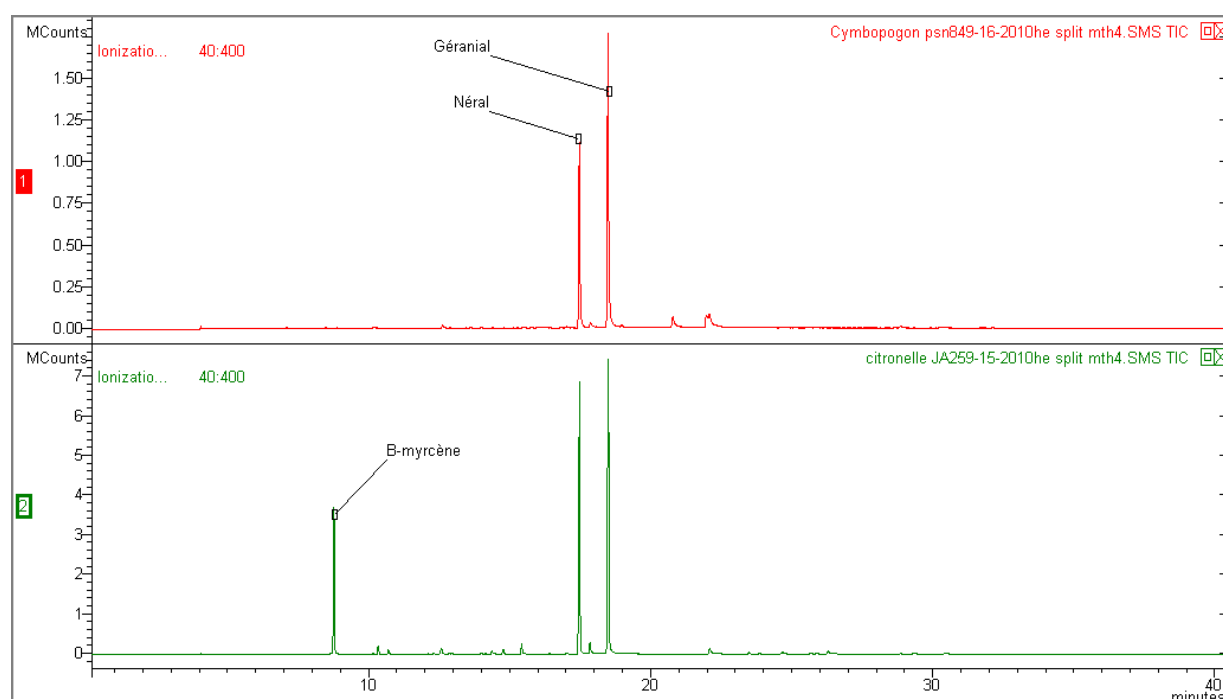


Figure 56 : Chromatogrammes en phase gazeuse et molécules majoritaires des deux lots d'huile essentielle de Cymbopogon citratus (lot 1: PSN84, en haut ; lot 2 : JA25, en bas) (colonne VF-5ms)

Dans les deux cas, les molécules majoritaires sont donc bien les isomères du citral, ce qui explique l'activité antifongique observée pour cette huile (lot 1 : néral 31 %, géraniol 56 % ; lot 2 : néral 34 %, géraniol 41 %). Pour le lot 2, légèrement moins actif que le lot 1, la présence de β -myrcène, un monoterpène hydrocarboné, est également observée en proportion non négligeable (14 %) (*Figure 57*). La plante hydodistillée pour l'obtention du premier lot d'huile essentielle (PSN84) a été récoltée sur la Route Nationale 2 au PK35 en avril 2007 (saison des pluies) et celle distillée pour l'obtention du second lot récoltée au PK8 de la Route Nationale 2 à Matoury en août 2008 (saison sèche), ces différences de lieu et de saison pouvant expliquer la différence de composition comme justifié plus haut.

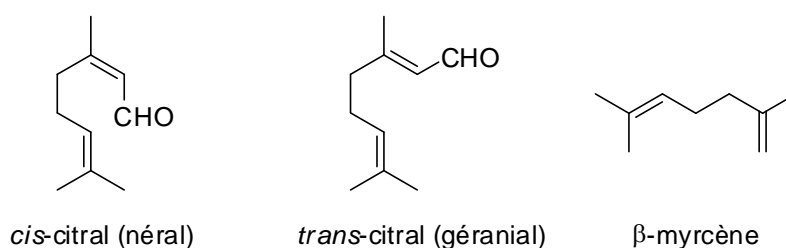


Figure 57 : Molécules majoritaires de l'huile essentielle de Cymbopogon citratus

Huile essentielle de Protium heptaphyllum (encens)

Dans le cas de *Protium heptaphyllum*, aucune référence n'a été trouvée dans la littérature concernant l'activité antifongique des huiles issues de cette espèce. Cet arbre, connu sous le nom vernaculaire d'« encens », fait partie de la famille des Burseraceae, qui comporte 41 espèces réparties en 6 genres en Guyane française (ONF, 2004). Les arbres de cette famille, plutôt présents en forêt dense et humide, sont caractérisés par de nombreux canaux de sécrétion et cavités produisant des oléorésines et gommes résineuses (Rüdiger *et al.*, 2007). Ces résines, riches en substances volatiles, sont utilisées en parfumerie comme matières premières odorantes ou comme fixateurs, pour la fabrication de vernis ou pour des utilisations médicales par les populations des zones où ces espèces sont présentes (Machado *et al.*, 2003; Ramos *et al.*, 2000). La résine est en particulier utilisée de façon traditionnelle pour le soin des plaies (bandages), comme émollient, antiseptique, et analgésique dans le cas de la fumée (Rüdiger *et al.*, 2007), ainsi que comme stimulant ou tonique, pour le soin des ulcères et comme anti-inflammatoire (Ramos *et al.*, 2000). Les activités de la résine mises en évidence en laboratoire sont les suivantes : antiseptique, anti-tumorale, acaricide, cercaricide (larvicide), anti-inflammatoire, immunostimulante et anti-cholinestérase (Ramos *et al.*, 2000; Rüdiger *et al.*, 2007; Siani *et al.*, 1999). Les huiles essentielles de feuilles et de fruits de *P. heptaphyllum* ont également montré des propriétés acaricides (Pontes *et al.*, 2007).

La composition chimique de l'huile essentielle obtenue à partir des résines et des feuilles d'encens en général, et du genre *Protium* en particulier, a été largement étudiée (Machado *et al.*,

2003; Ramos *et al.*, 2000; Siani *et al.*, 2004; Siani *et al.*, 1999). La composition de l'huile essentielle de fruits immatures de *Protium heptaphyllum* a été décrite dans le cadre d'une étude sur l'activité acaricide des huiles (Pontes *et al.*, 2007). Le composé majoritaire présent dans l'huile était l' α -terpinène (47,6 %), suivi de l'acétate d' α -terpinyle (5 %), de l'acétate d'*iso*-dihydro-carvéol et du limonène (3,7 % chacun).

Dans le cas de notre étude, le chromatogramme suivant a été obtenu (Figure 58) :

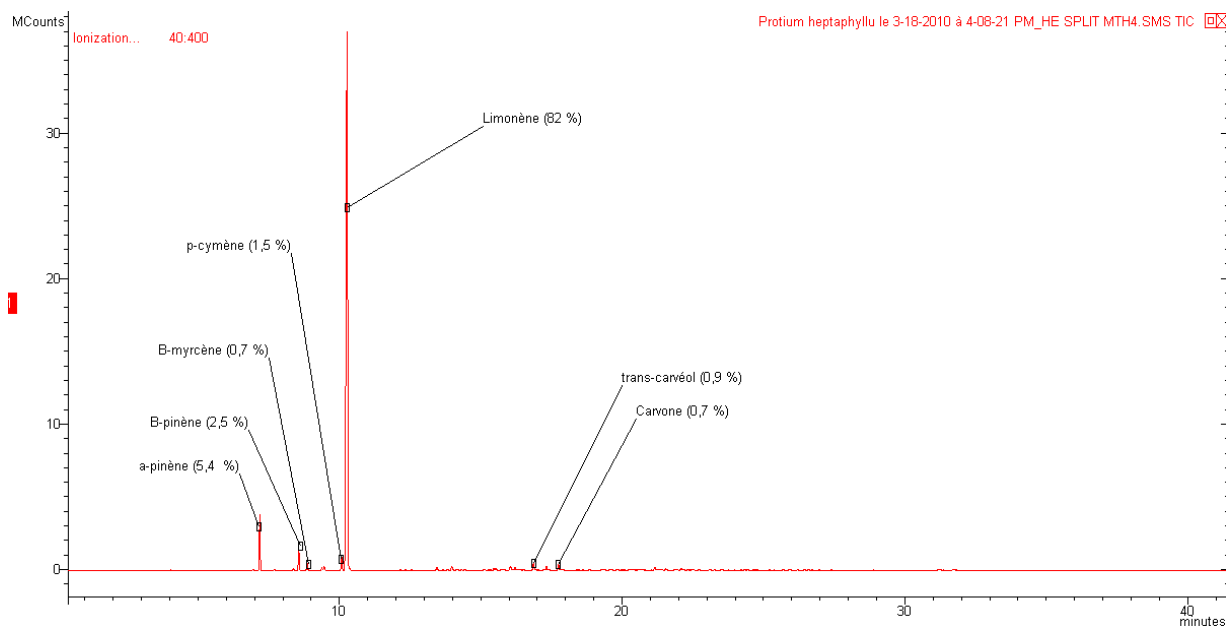


Figure 58 : Chromatogramme en phase gazeuse et molécules majoritaires de l'huile essentielle de fruits verts de *Protium heptaphyllum* (colonne VF-5ms)

Une détermination de la composition de l'huile essentielle de fruits immatures de *Protium heptaphyllum* a montré que celle-ci est presque exclusivement composée de limonène (82 %), ainsi que de faibles proportions d' α -pinène (5,4 %), de β -pinène (2,5 %), de *para*-cymène (1,5 %), de *trans*-carvéol (0,9 %) ainsi que de β -myrcène et de carvone (0,7 % dans les deux cas) (Figure 59). Les trois molécules majoritaires ont été testées pour leur éventuelle activité antifongique sur les souches de levures et de champignons dermatophytes sélectionnées. Les CIM mesurées ont toutes été ≥ 62 $\mu\text{g/ml}$ pour ces produits en ce qui concerne les 6 souches testées dans ce criblage. L'activité de l'huile essentielle ne peut donc être attribuée à une de ces molécules majoritaires. Cette activité peut donc être due à un phénomène de synergie entre les constituants de l'huile, ou à l'activité d'un des autres composés, non testé dans le cadre de cette étude. Ce type de phénomène a été mis en évidence dans le cas de l'huile essentielle de baies de *Juniperus communis* L. (Filipowicz *et al.*, 2003). Trois huiles différentes ont été testées, la plus active en particulier sur *C. albicans* étant celle composée majoritairement d' α -pinène (22,9 %), de *para*-cymène (10 %), de limonène (6,5 %) et de β -pinène

(5,6 %). Or aucun des composés testés isolément, bien que présentant une inhibition de la croissance fongique, n'a pu expliquer la totalité de l'activité de l'huile. Les auteurs attribuent donc cette activité au mélange spécifique composant l'huile ou à l'activité d'un composé minoritaire non identifié. L'hypothèse de l'importance du mélange de molécules est fortement étayée par une publication récente (Tserennadmid *et al.*, 2011), dans laquelle les auteurs mettent en évidence une synergie (CIF de 0,375) entre l' α -pinène et le limonène sur la levure *S. cerevisiae*.

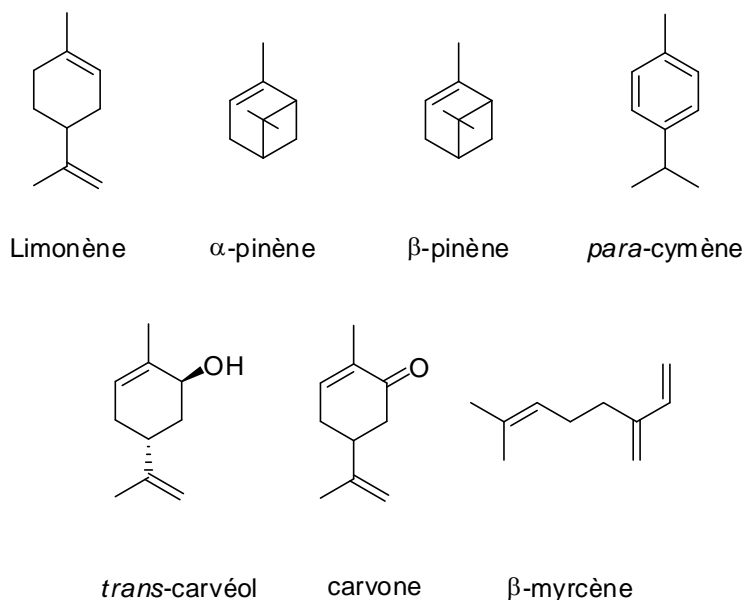


Figure 59 : Molécules majoritaires de l'huile essentielle de fruits immatures de *Protium heptaphyllum*

Une étude plus approfondie de cette huile et de son activité, du type de celle effectuée sur l'huile essentielle d'*O. azureus* sera réalisée dans les meilleurs délais, l'huile essentielle de fruits immatures de *P. heptaphyllum* semblant présenter à la fois un fort potentiel thérapeutique et un mécanisme d'action original.

Huile essentielle de *Pimenta racemosa* (bois d'Inde)

Le bois d'Inde est une plante aromatique de la famille des Myrtaceae originaire des îles et des régions continentales du bassin caribéen, où elle est utilisée comme épice et aromate (feuilles et baies) ou en thérapeutique populaire (préparations réalisées à partir de l'huile essentielle des parties aériennes) (Bourgeois, 1995). L'huile essentielle de *P. racemosa* est également employée en parfumerie et cosmétologie. Cette espèce comporte plusieurs variétés, en particulier *P. racemosa* var. *racemosa*, elle-même représentée par trois sous-variétés distinguées par leur chemotype : un chemotype eugénol / chavicol à odeur de girofle (correspondant à l'appellation bois d'Inde), un chemotype estragole / méthyl eugénol (odeur d'anis) et un chemotype néral / géraniol à odeur de citronnelle (Abaul *et al.*, 1995; Bourgeois, 1995).

L'huile essentielle de bois d'Inde ainsi que l'eugénol testé isolément ont démontré une inhibition de la croissance de souches fongiques des phytopathogènes *Pythophthora cactorum* et *Cryptonectria parasitica* (Kim *et al.*, 2008). L'évaluation de l'activité antifongique sur plusieurs souches de bactéries et de champignons, en particulier *C. albicans*, des huiles essentielles des trois chemotypes de *P. racemosa* var. *racemosa* a mis en évidence une meilleure inhibition de la croissance des souches par l'huile la plus riche en néral et géraniol par rapport aux huiles des chemotypes eugénol / chavicol et méthyl eugénol / méthyl chavicol, ces deux derniers chemotypes étant cependant actifs sur *C. albicans* (Aurore *et al.*, 1998). Ce résultat confirme l'activité du néral et du géraniol déjà démontrée dans le cas de l'huile essentielle de *C. citratus*.

L'huile essentielle testée dans le cadre de cette étude correspond au chémotype eugénol (67 %) / chavicol (13 %) (Figures 60 et 61). Son activité peut donc être expliquée en particulier du fait de la présence d'eugénol, molécule aux propriétés antifongiques connues (Cheng *et al.*, 2008; Lee *et al.*, 2007; Yen et Chang, 2008).

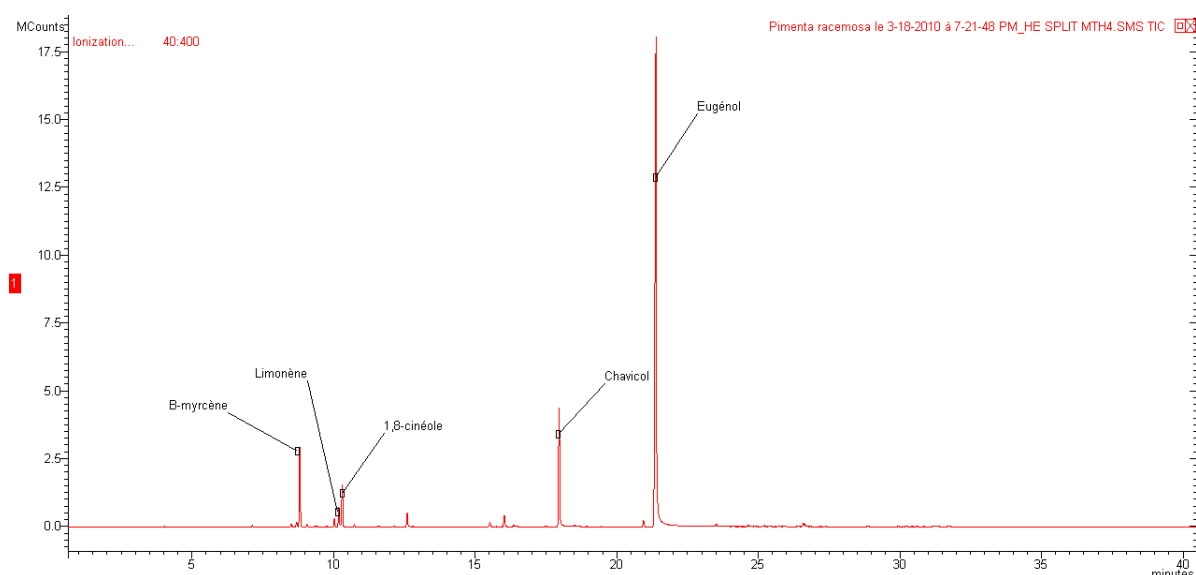


Figure 60 : Chromatogramme en phase gazeuse et molécules majoritaires de l'huile essentielle de *Pimenta racemosa* (colonne VF-5ms)

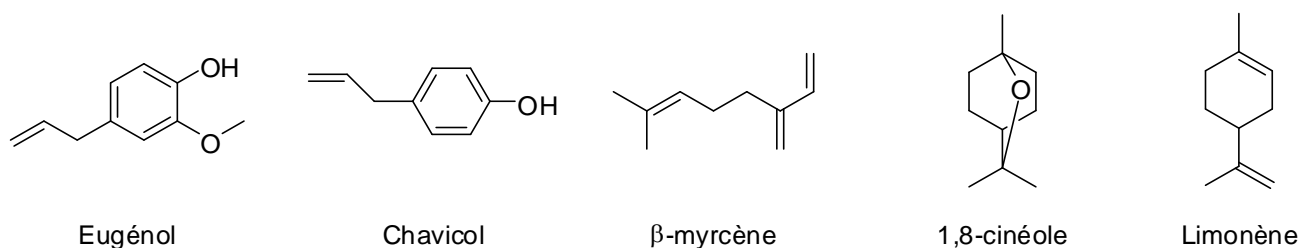


Figure 61 : Molécules majoritaires de l'huile essentielle de *Pimenta racemosa*

2. Etude statistique des données par analyse en composantes principales (ACP) : vers un outil de prévision de l'activité antifongique ?

Lors du criblage décrit dans le point précédent, ainsi que dans l'étude portant sur l'huile essentielle d'*O. azureus*, plusieurs mécanismes d'action liés à la composition des huiles ont été mis en évidence par des tests effectués au laboratoire ou par l'étude bibliographique : rôle prépondérant d'une ou deux molécules du mélange expliquant son activité (néral et géraniol pour *C. citratus*, eugénol pour *P. racemosa*), présence d'une molécule active si testée de façon isolée, mais n'expliquant pas toute l'activité de l'huile (α -copaène de l'huile essentielle d'*O. azureus*) ou molécules inactives seules mais inhibant fortement la croissance des champignons dans le cadre du mélange spécifique identifié dans l'huile essentielle de *P. heptaphyllum*.

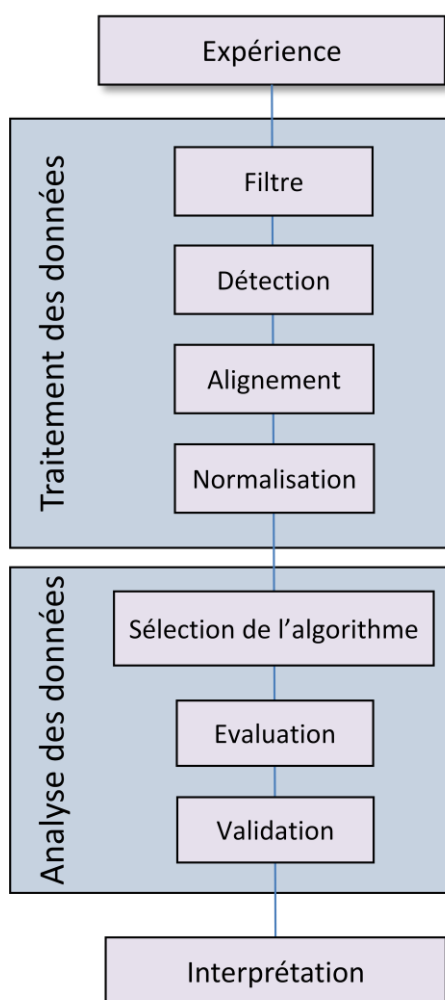
Afin d'aller plus loin en essayant de mettre en évidence un ou plusieurs profil globaux liant composition chimique et activité biologique d'une huile essentielle, et de comprendre les effets de ces mélanges complexes, une étude statistique par analyse en composantes principales des métabolites volatils produits par ces plantes a été effectuée sur les 24 huiles testées précédemment.

La métabolomique se définit comme « l'analyse à la fois quantitative et qualitative de tous les métabolites d'un organisme » (Verpoorte *et al.*, 2007). Cette stratégie d'étude est donc intrinsèquement liée aux techniques d'analyses multivariées permettant de traiter de larges jeux de données. Dans le cas de mélanges complexes, les profils peuvent ainsi être observés, analysés et interprétés, par exemple en les liant avec une activité biologique donnée (Heinrich, 2008). En ce qui concerne l'acquisition des données, la spectrométrie de masse est devenue une méthode de choix, du fait de sa rapidité, de sa sensibilité et de ses champs d'application larges (Dettmer *et al.*, 2007; Hall, 2005). Dans le cas de notre étude, cette technique de détection est précédée d'une séparation des composés par chromatographie en phase gazeuse. Les données doivent ensuite être collectées et traitées. Une des méthodes de statistique multivariée les plus employées est l'analyse en composantes principales (ACP), mise au point par Pearson, qui permet la visualisation des données par transformation des variables liées entre elles (ou corrélées) en nouvelles variables orthogonales indépendantes les unes des autres. Les données sont représentées par un espace à n dimensions, n étant le nombre de variables, et réduites à des composantes principales qui sont les dimensions dans lesquelles les données sont décrites, mettant en relief les variations maximales enregistrées entre ces données. Ces composantes principales représentent donc les axes permettant d'observer d'éventuels regroupements dans le jeu de données (Boccard *et al.*, 2010; Ward *et al.*, 2003; Weckwerth et Morgenthal, 2005).

Dans le cas des données issues de la spectrométrie de masse, un pré-traitement est nécessaire préalablement à l'analyse statistique en elle-même (Hall, 2005). Ce type de méthode a par

exemple été développé au sein de l'équipe de M. Katajamaa et M. Oresic, avec la mise au point d'un logiciel de pré-traitement et d'analyse de données : MZmine¹⁷ (Katajamaa *et al.*, 2006; Katajamaa et Oresic, 2005; 2007; Pluskal *et al.*, 2010). Ce logiciel, centré au départ sur l'analyse des données obtenues en LC/MS, mais tout à fait adapté à la GC/MS, permet de filtrer le bruit, de détecter et d'aligner les pics observés en chromatographie, de normaliser les données et de visualiser les résultats obtenus suite à différents types d'analyses. L'analyse en composantes principales a cependant été au final réalisée grâce au logiciel XLstat après importation des données pré-traitées par MZmine et normalisation des hauteurs des pics obtenus.

La méthodologie de l'analyse est résumée par la *Figure 62* :



*Figure 62 : Résumé des étapes de traitement et d'analyse des données dans une approche classique de métabolomique.
D'après (Boccard et al., 2010; Katajamaa et Oresic, 2007).*

¹⁷ <http://mzmine.sourceforge.net/index.shtml>

Le premier objectif de cette étude était de mettre au point une méthode d'analyse statistique des données non seulement issues des spectres de masse (rapport m/z , intensités relatives des fragments) mais également des données issues de l'analyse chromatographique (temps de rétention, intensités relatives des pics), soient au final des données en trois dimensions (temps de rétention, rapports m/z , intensités), sans chercher à identifier individuellement les constituants des huiles essentielles (démarche de « metabolic fingerprinting ») (Dettmer *et al.*, 2007; Hall, 2005). Dans un second temps, il serait ensuite possible d'identifier certains des constituants afin d'aboutir à une meilleure compréhension des phénomènes intervenant dans l'activité antifongique des huiles. La méthode de traitement et d'analyse des données employée ici a tout d'abord été mise au point sur un lot de 60 huiles essentielles commerciales dont les activités antifongiques ont été évaluées au laboratoire, puis appliquée aux huiles essentielles issues de la flore guyanaise (voir Matériel & Méthodes).

Le résultat obtenu pour l'analyse est présenté sous forme de graphique des individus, ou « score plot ». Afin de faciliter la lecture, un score d'activité de chaque huile essentielle sur les champignons testés a été calculé et ajouté au nom de l'espèce sur le graphique. Ce score est d'autant plus élevé que les valeurs de CIM relevées sont faibles, donc d'autant plus élevé que l'huile inhibe la croissance d'un plus grand nombre de souches : pour une CIM > 500 $\mu\text{g/ml}$ le score est nul, égal à 1 pour une CIM de 500 $\mu\text{g/ml}$, 2 pour une CIM de 250 $\mu\text{g/ml}$... (voir chapitre Matériel et Méthodes p.188). Trois analyses successives ont été réalisées : une première sur les levures seules (genre *Candida*), une seconde sur les champignons dermatophytes filamenteux et une troisième sur l'ensemble des souches. Les résultats obtenus sont présentés ci-dessous (*Figures 63, 64 et 65*).

Grâce aux scores d'activités calculés par cette méthode sur le genre *Candida*, les huiles mises en évidences comme les plus actives sont : *P. heptaphyllum* (score de 10), *C. citratus* lot 2 (9), *C. citratus* lot 1 et *O. azureus* (8), *S. trilobata* (5) et *P. racemosa* (4) (chromatogrammes présentés en Annexe 22). Dans ce cas de figure, 39 % de la variabilité est expliquée par les deux composantes, avec 25 % pour la première composante 1 (axe horizontal) et 14 % pour la seconde (axe vertical). Le graphique obtenu (*Figure 63*) montre globalement trois zones distinctes : une zone dans la moitié supérieure du graphique, le long de l'axe vertical dans laquelle ne se trouvent que des huiles inactives exceptée l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus*. La zone la plus centrale contient le plus grand nombre d'huiles actives, et dans la dernière la zone, la plus à droite le long de l'axe horizontal, seule l'huile essentielle de *P. heptaphyllum* a été mise en évidence comme active. Les huiles essentielles représentées le long des deux axes possèdent l'une ou l'autre des composantes principales choisies par le logiciel pour expliquer la variabilité, alors que celles représentées au centre du graphique ne possèdent pas ces composantes, et sont donc par définition toutes différentes. Ainsi, plus le point représentant un individu est éloigné de l'origine du graphique, plus sa composition est proche de celle des individus voisins. Au contraire, les points proches de l'origine représentent des individus dont les

compositions en molécules volatiles sont très différentes les unes des autres. Dans l'optique d'un outil de prévision de l'activité antifongique d'une huile essentielle, ce graphique permet donc de donner une réponse partielle : une huile dont l'analyse de la composition la place vers les extrémités des axes sera donc a priori inactive, et une huile représentée plutôt au centre du graphique aura de fortes chances d'inhiber la croissance *in vitro* des levures du genre *Candida*, des exceptions étant cependant possibles.

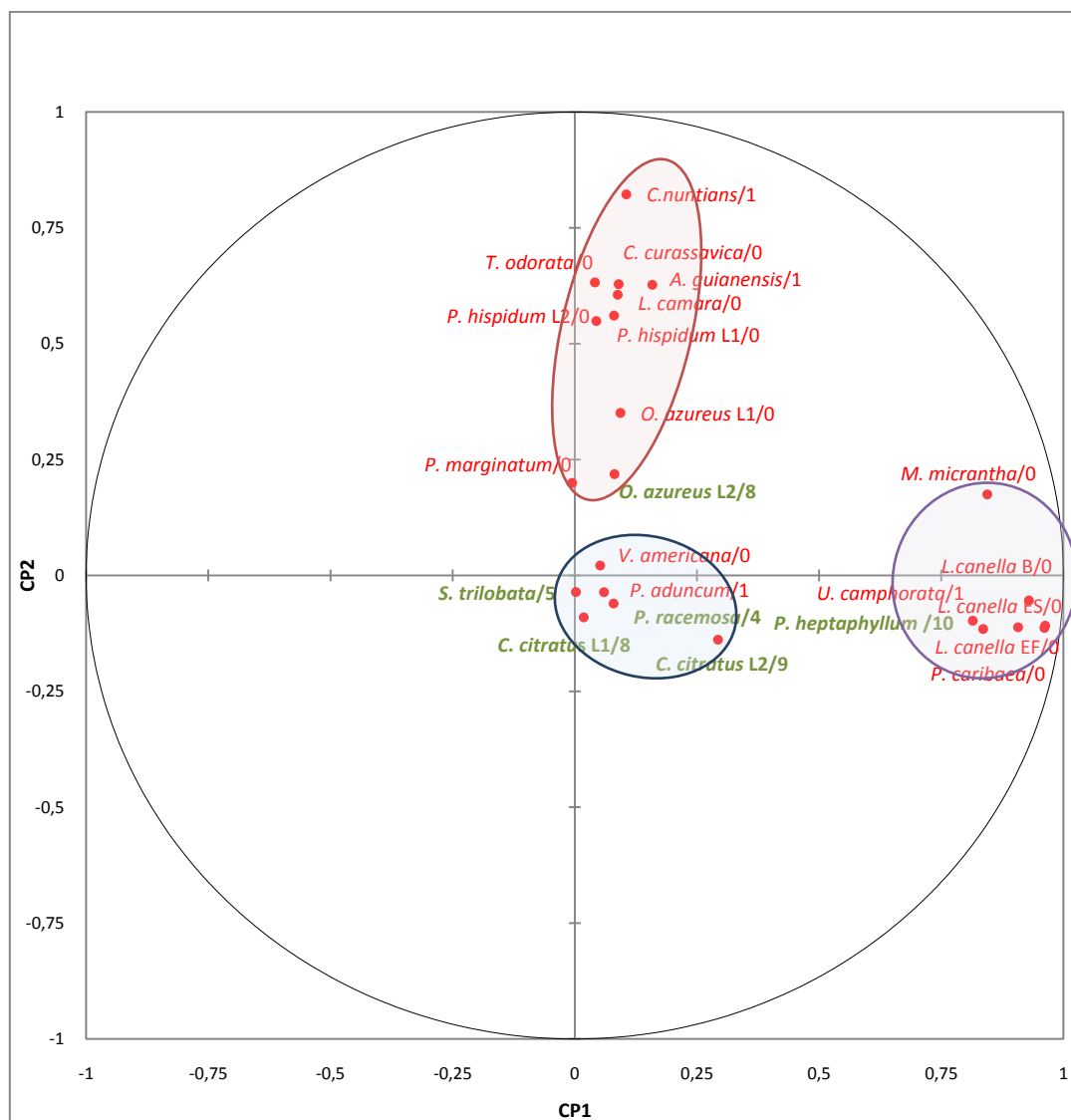


Figure 63 : Analyse en composantes principales des profils GC/MS obtenus pour les huiles essentielles avec indications des scores d'activité antifongique sur les levures du genre *Candida*. Légende : L1 : lot 1 ; L2 : lot 2.

Ainsi, toutes les huiles inactives présentes vers le haut de l'axe de la seconde composante principale ont une composition chimique relativement proche (Annexe 22). Dans le cas de *C. curassavica*, *C. nuntians*, *L. camara*, *T. odorata* et *A. guianensis*, l'huile est majoritairement composée de sesquiterpènes, principalement hydrocarbonés (β -caryophyllène par exemple, majoritaire pour *C. nuntians*, *L. camara* et *T. odorata*, avec dans certains cas une proportion plus ou

moins marquée de monoterpènes (notamment de l' α -pinène, majoritaire pour *C. currassavica*). Les huiles essentielles de *Piper hispidum* sont également plutôt constituées de sesquiterpènes hydrocarbonés. Seule l'huile essentielle d'*O. azureus* se distingue vraiment par une plus forte proportion de sesquiterpènes oxygénés, et c'est également la seule de cette zone qui soit active. De plus, elle est l'huile essentielle située le plus vers l'origine des axes pour toutes celles de ce groupe.

Il est intéressant de se pencher sur le cas des huiles situées le plus à droite le long de l'axe de la première composante principale (Annexe 22). Elles sont en effet toutes composées d'un monoterpène ultra-majoritaire, qui s'avère être le limonène dans le cas de *P. heptaphyllum* (la plus active) et des huiles essentielles de *L. canella* (inactives). Dans ce cas de figure il semble donc effectivement que la molécule majoritairement présente n'explique pas forcément l'inhibition ou non de la croissance fongique par une huile essentielle, mais que la composition globale de l'huile, aussi bien qualitativement que quantitativement, influe donc fortement sur son activité.

Enfin, parmi les huiles essentielles situées dans la zone la plus centrale, une grande diversité de compositions a été remarquée lors de l'analyse GC/MS, avec aussi bien des huiles contenant un mélange complexe de molécules volatiles (*O. caeruleus*, *P. hispidum*, *V. americana*, *P. marginatum*) que des huiles composées majoritairement d'une ou deux molécules (*C. citratus* (citrail), *P. racemosa* (eugénol), *P. aduncum* (dillapiol), *S. trilobata* (α -pinène)). Ceci montre bien la complexité des phénomènes mis en jeu dans le cas de l'activité antifongique des huiles essentielles.

Le même travail a été effectué en attribuant des scores d'activité sur les trois souches de champignons dermatophytes filamenteux testés (*M. canis*, *M. gypseum*, *T. mentagrophytes*). Le graphique issu de l'analyse en composantes principales se présentent donc comme suit (Figure 64). Les huiles essentielles testées étant globalement plus actives sur les champignons filamenteux que sur les levures, les scores d'activité calculés sont moins discriminants que dans le premier cas. Pour faciliter la lecture, seules les huiles ayant obtenu un score supérieur à 10 ont été mises en valeur sur le graphique. Si on compare les résultats obtenus dans le cas des champignons filamenteux à ceux obtenus pour les levures, on remarque que :

- les huiles les plus actives se situent toujours le long de l'axe de la seconde composante principale, plutôt vers l'origine du graphique (*C. citratus*, *P. racemosa*, *S. trilobata*, zone centrale),
- il existe toujours une zone à l'extrémité de l'axe de la première composante principale avec des huiles possédant une activité (*P. heptaphyllum* et *L. canella*, toutes deux riches en limonène)
- l'extrémité supérieure de l'axe vertical (seconde composante principale) regroupe toujours une majorité d'huiles inactives ou moins actives, avec comme exceptions *O. azureus* comme

dans le cas des levures, située à l'extrémité inférieure de cette zone, et *C. nuntians*, située à l'extrémité supérieure de la zone.

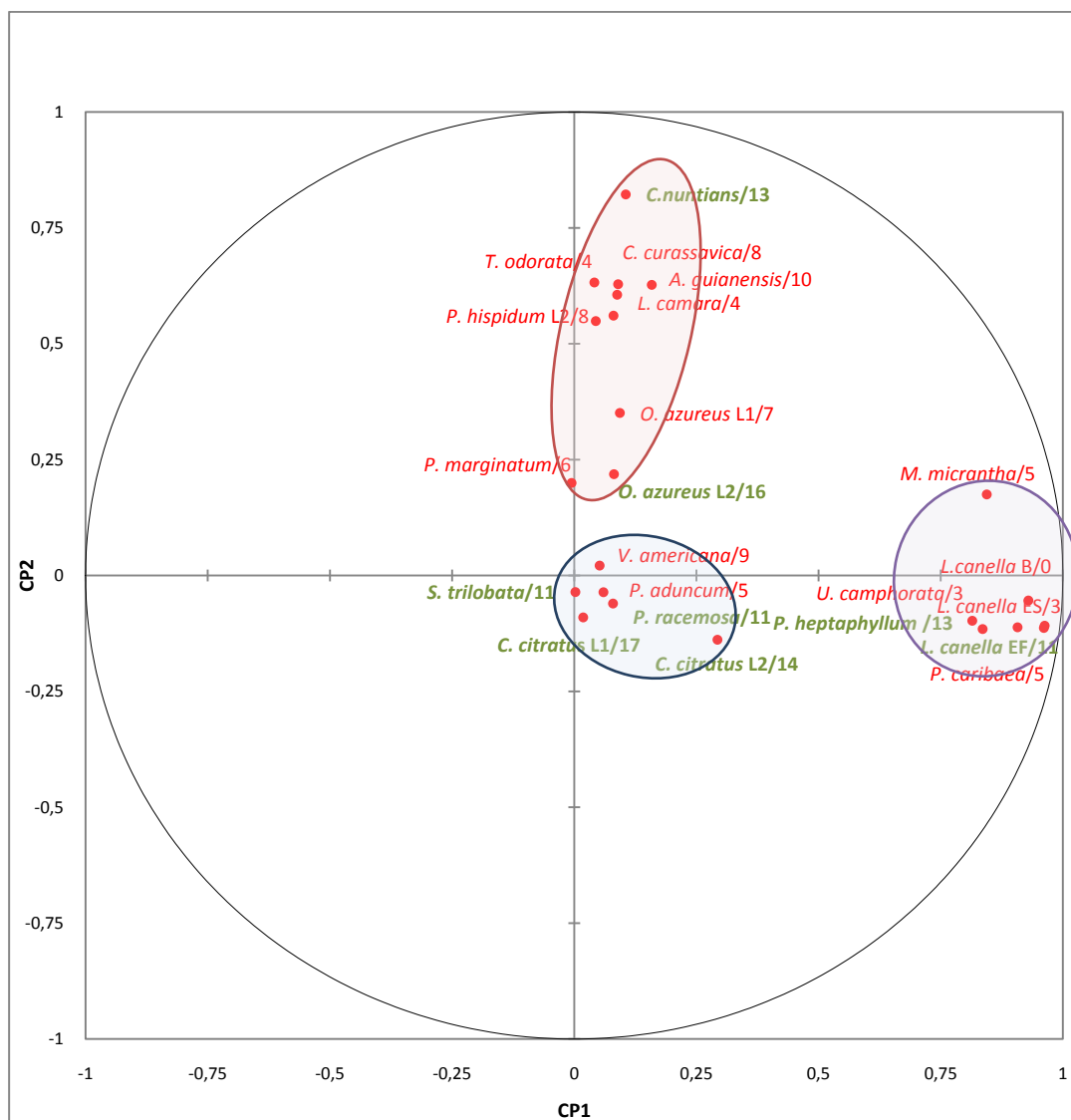


Figure 64 : Analyse en composantes principales des profils GC/MS obtenus pour les huiles essentielles avec indications des scores d'activité antifongique sur les champignons dermatophytes filamenteux. Légende : L1 : lot 1 ; L2 : lot 2.

En conclusion, cet outil semble légèrement moins discriminant dans le cas des champignons dermatophytes filamenteux, mais ceci est principalement dû au fait que les huiles essentielles présentent fréquemment une activité dans ce cas de figure. L'analyse est donc moins sélective. Au vu des différences obtenues dans le cas des levures et des dermatophytes, cette étude met également nettement en évidence le fait que les mécanismes d'action des huiles essentielles sur ces deux types de micro-organismes sont différents, certains composés ou mélanges de composés étant anti-dermatophytes et d'autre anti-*Candida* (Silva *et al.*, 2009b).

Pour finir, le graphique représentant le résultat de l'analyse en composantes principales avec l'indication du score d'activité total a été représenté (Figure 65) :

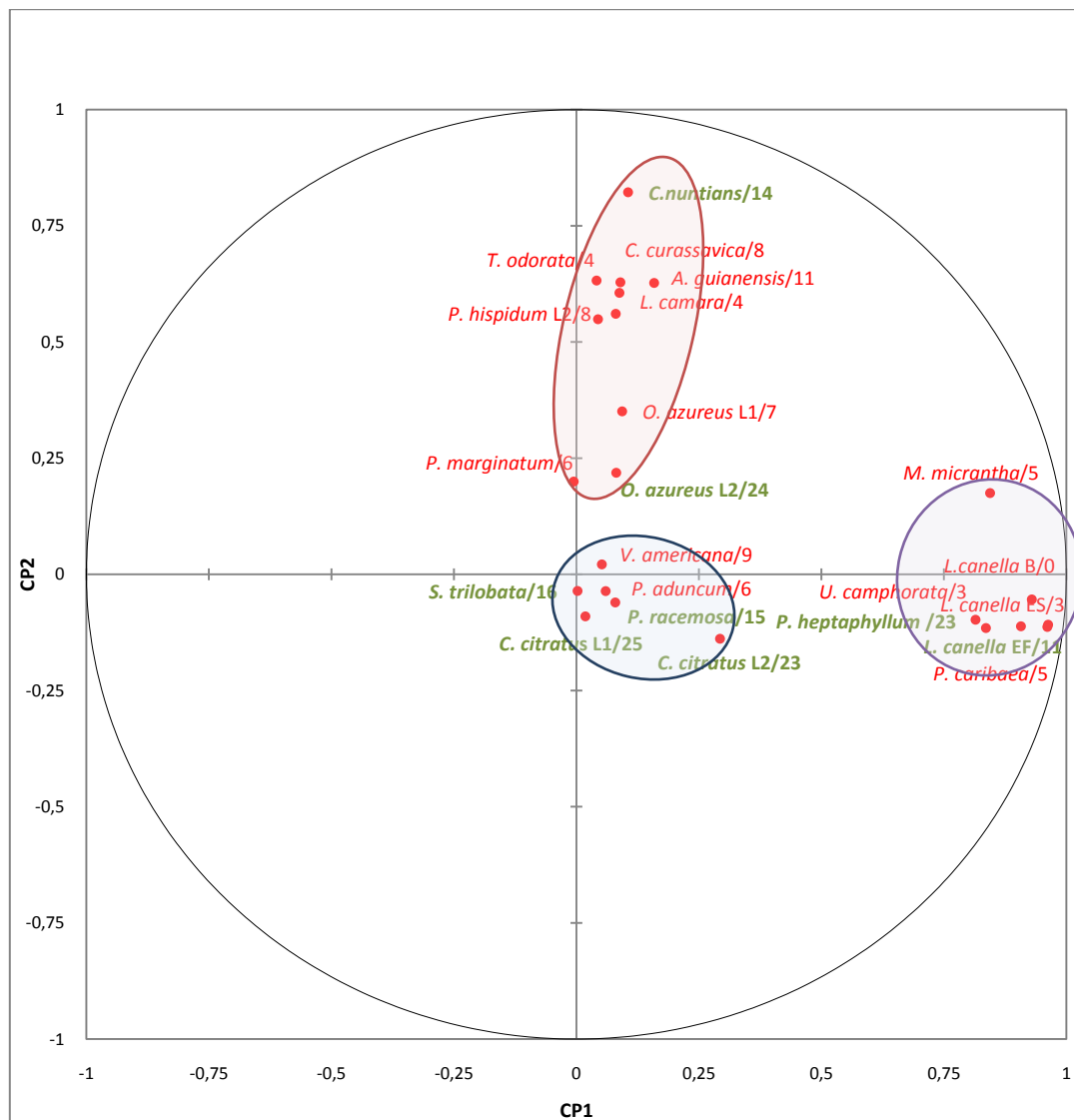


Figure 65 : Analyse en composantes principales des profils GC/MS obtenus pour les huiles essentielles avec indications des scores d'activité antifongique totale (levure et champignons dermatophytes filamenteux). Légende : L1 : lot 1 ; L2 : lot 2.

Les mêmes zones de regroupement que précédemment sont définies pour les huiles essentielles. Ceci est logique puisque le score d'activité total a été calculé en faisant la somme des scores sur chacun des deux types de micro-organismes, et les valeurs de CIM obtenues sur les champignons filamenteux étant nettement inférieures à celles obtenues sur les levures (et donc leur score d'activité beaucoup plus élevé). Les mêmes conclusions peuvent donc dans ce cas être tirées sur l'activité antifongique globale des huiles essentielles que sur leur activité inhibitrice de la croissance des champignons filamenteux.

Ainsi, si l'analyse statistique des données GC/MS des huiles essentielle est fréquemment utilisée dans la littérature (sous la forme d'analyses en composantes principales (ACP) ou d'analyses des clusters (AHC) pour l'obtention de dendrogrammes) dans une optique de chimiotaxonomie (Amparo Blasquez *et al.*, 2003; Ronse *et al.*, 1997), celle-ci peut également être utilisée afin de lier composition chimique et activité biologique. Le meilleur résultat est obtenu dans le cas des levures du genre *Candida*, pour lesquelles une zone nette d'exclusion a été définie. Dans le cas des champignons dermatophytes filamenteux ou de l'activité globale, il s'agit plutôt de zones donnant un pourcentage de chance d'obtenir une huile inhibant la croissance fongique. Cette étude met en tout cas très nettement en évidence la complexité des phénomènes intervenant dans l'activité antifongique des huiles essentielles.

3. Conclusion sur le criblage des huiles essentielles

Cette partie a été menée en plusieurs étapes : un criblage des huiles essentielles afin de rechercher des produits inhibant la croissance fongique, mais également de comparer les deux méthodologies utilisées (diffusion en agar et microdilution), suivi d'une étude statistique visant à évaluer s'il est possible de corréler la composition chimique d'une huile essentielle à son activité antifongique.

Le criblage a permis de mettre en évidence plusieurs huiles possédant une activité inhibitrice de la croissance des champignons, aussi bien les levures que les champignons filamenteux : *C. citratus*, *O. azureus* et *P. heptaphyllum*, ainsi dans que de façon un peu moins marquée *P. racemosa* et *S. trilobata* (Figure 66). Dans le cas de la citronnelle (lemongrass) et du bois d'Inde ces activités antifongiques avaient déjà été mises en évidence, sur les souches testées ici ou sur d'autres, et le mécanisme de leur action élucidé (rôle prépondérant d'une ou deux molécules ultra-majoritaires). Dans le cas des trois autres huiles, ces activités n'avaient jamais été décrites à notre connaissance, et les mécanismes mis en jeu font a priori intervenir des phénomènes de synergie plus ou moins marqués entre les différents constituants expliquant l'activité de ces huiles essentielles. Ce criblage a également montré l'intérêt des essais effectués par la méthode de microdilution dans le cas des huiles essentielles, même si les résultats obtenus lors des deux tests étaient globalement cohérents.

L'analyse en composantes principales n'a pas permis de mettre en évidence un lien très net entre composition chimique et activité antifongique, mais aboutit cependant à plusieurs conclusions :

- Deux zones de quasi-exclusion peuvent être définies aux extrémités des axes,
- Une zone de forte probabilité d'obtenir une huile antifongique (sur les levures ou les champignons filamenteux) se trouve vers l'origine du graphique,

- Les huiles présentes dans cette zone se caractérisant par des compositions chimiques très différentes, cette analyse met donc en évidence la complexité des phénomènes intervenant dans l'explication de l'activité antifongique des huiles essentielles,
- Cette analyse illustre graphiquement le fait que certains composés ou mélanges de composés possèdent plutôt une activité anti-dermatophytes ou une activité anti-*Candida*.

Ce type d'analyse mériterait donc d'être approfondi, à la fois dans l'optique de la mise au point d'un outil prévisionnel de l'activité plus précis, mais aussi dans le but de mieux comprendre les phénomènes mis en jeu dans ce type d'activité biologique de produits naturels.



Figure 66 : *Sphagneticola trilobata* (L.) Pruski

Chapitre 3 : Conclusion

L'objectif de cette dernière partie du travail était de rechercher des composés à activité antifongique sur la base d'une stratégie bioinspirée, en partant du principe que les composés permettant aux plantes d'interagir avec leur environnement, et en particulier de se défendre contre les agressions des micro-organismes dans leur milieu naturel, pourraient également se révéler actif vis-à-vis d'autres micro-organismes, les champignons pathogènes pour l'homme. Il a ainsi été mis en évidence que sur 23 huiles essentielles testées, de 14 à 36 % (selon la méthode d'évaluation de l'activité antifongique utilisée) des huiles essentielles se sont révélées très actives sur les souches choisies, inhibant fortement aussi bien la croissance des levures que celle des champignons dermatophytes filamenteux, et qu'au total de 68 à 82 % des huiles essentielles ont démontré une activité intéressante, en particulier sur les champignons filamenteux. La recherche de composés antifongiques parmi les composés volatils utilisés pour la défense des végétaux se révèle donc efficace, ce qui corrobore les données de la littérature au vu du nombre d'études relatives aux activités antifongiques des huiles essentielles.

Dans le cadre de cette étude, l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* a été étudiée de façon détaillée. Nous avons ainsi en particulier pu observer des effets importants de synergie entre cette huile et les antifongiques azolés, en particulier l'itraconazole et le cétoconazole. A la lecture des résultats obtenus pour cette huile seule ou en combinaison, et du fait de sa non toxicité, il apparaît nettement qu'elle possède un fort potentiel de valorisation thérapeutique. Des études complémentaires pourront être menées afin d'explicitier de façon plus précise le rôle de ses composants dans le cadre de cette activité antifongique. Une seconde huile dont les propriétés antifongiques n'ont jamais été décrites jusqu'alors, l'huile essentielle de fruits immatures de *Protium heptaphyllum*, a également montré une forte activité antifongique, et pourra être étudiée plus avant.

Enfin, l'analyse statistique des compositions des huiles essentielles analysées par GC/MS a permis de mettre en place un outil pouvant orienter l'étude des propriétés antifongiques des huiles essentielles vers les espèces les plus susceptibles de présenter une activité, et a mis en relief la complexité des mécanismes mis en jeu.

Pour certains auteurs, il est cependant dommage que certains produits ne soient évalués que vis-à-vis d'une seule espèce ou d'une seule classe de micro-organismes (Cos *et al.*, 2006). En parallèle du travail effectué dans le cadre de cette thèse, une évaluation de l'activité antileishmanienne des huiles essentielles – le mécanisme d'action semblant identique entre ce parasite et les champignons, les membranes contenant dans les deux cas une forte proportion d'ergostérol (Odonne, 2010) – a été effectuée par l'équipe du Dr Eric Deharo (UMR 152 IRD/UPS) à Lima. Les premiers résultats obtenus sont prometteurs, en particulier pour les huiles essentielles d'*Otacanthus azureus*, de *Piper hispidum* et dans une moindre mesure de *Protium heptaphyllum*, confirmant ainsi l'intérêt de ces produits.

Conclusion générale et perspectives

L'objectif de ce travail était la recherche de nouvelles substances actives d'origine végétale, présentant soit une activité antipaludique, soit une activité antifongique. Cette étude a été menée suivant deux stratégies différentes : l'étude de remèdes traditionnels antipaludiques identifiés suite à des enquêtes ethnopharmacologiques, et la mise en évidence des propriétés antifongiques d'huiles essentielles grâce à une stratégie bioinspirée. La première partie de ce travail correspond à une méthode plus « ancienne », associée principalement au fractionnement bioguidé des extraits afin d'en isoler le ou les composés actifs. Elle a permis de mettre en évidence pour les deux remèdes étudiés deux modes d'actions différents : dans le cas des tisanes de feuilles de *Q. amara*, une unique molécule, la simalikalactone D, est responsable de l'activité, alors que dans le cas de *P. acutangulum* (décoction de rameaux), il s'agit d'un mélange contenant des flavonols glycosylés. Le premier résultat pourrait donc aboutir à un regain d'intérêt vis-à-vis de cette molécule ou de ses analogues, et des études de combinaison entre ce composé et les médicaments antipaludiques actuels sont actuellement en cours de publication. Dans le second cas, la voie de valorisation serait plutôt le développement d'un médicament phytothérapeutique, le remède ne présentant pas de toxicité, afin de permettre un accès aisé à un traitement antipaludique. De nombreuses études sont cependant encore nécessaires avant de pouvoir, dans un cas comme dans l'autre, aboutir à des recommandations d'usage. La seconde partie de ce travail correspond à une approche plus « moderne », couplant bioinspiration et aspect métabolomique. Le nombre important d'huiles essentielles antifongiques mises en évidence montre bien la validité de cette démarche bioinspirée. En particulier, l'huile essentielle d'*O. azureus* a démontré une excellente activité, en particulier en ce qui concerne l'inhibition de la croissance des champignons dermatophytes filamenteux. Elle agit également en synergie avec les antifongiques du marché, et n'est pas cytotoxique. Tous ces aspects en font un produit original pouvant potentiellement être valorisé pour des applications thérapeutiques. L'étude métabolomique de la composition des huiles essentielles a permis de mettre au point un outil pouvant orienter la sélection des huiles en fonction des données obtenues en GC/MS dans l'optique de la recherche de nouvelles substances antifongiques.

L'ensemble de ces travaux confirme l'intérêt des substances naturelles dans le cadre de la recherche de composés bioactifs, ainsi que la validité des stratégies retenues – ethnopharmacologie et bioinspiration – dans la recherche de nouvelles molécules d'intérêt thérapeutique. L'étude des utilisations traditionnelles des plantes reste pertinente, surtout dans le contexte guyanais où l'usage des plantes médicinales reste vivace. Menées de façon rationnelles, ces études permettent d'éclairer les propriétés médicinales de certaines espèces. De façon générale, ces travaux participent également à une meilleure connaissance de la chimio- et de la biodiversité des espèces d'Amazonie guyanaise, premier pas vers une meilleure préservation de cet environnement.

Matériel et méthodes

Données générales

1. Chromatographie liquide haute performance (CLHP) analytique et semi-préparative

Pour tous les fractionnements et analyses effectuées en CLHP, les solvants utilisés (acétonitrile et eau) sont de qualité CLHP. L'eau a été obtenue à partir d'un système Milli-Q (Milli-Q plus, Millipore Bedford, MA).

Les fractionnements ont été effectués sur une chaîne HPLC semi-préparative Waters équipée d'une colonne de type C18 (Supelco Discovery®, 25 cm x 21,2 mm, 5 µm ou 15 cm x 4,6 mm, 5 µm), avec un débit de 15 mL/min. La détection a été réalisée en UV sur un détecteur Waters à double longueur d'onde (W2487). Les fractions ont été recueillies à l'aide d'un collecteur de fractions (Waters Fraction Collector III) dans des tubes à hémolyse (100 mm x 8 mm).

Les diverses fractions obtenues ont été évaporées au speed vac (Savant SPD 121 P) sous pression réduite, avec centrifugation, et à température inférieure à 37°C.

Les analyses ont été effectuées sur deux chaînes CLHP analytiques (CLHP Waters et CLHP Varian, colonnes Supelco Discovery® C18, 15 cm x 4,6 mm, 5 µm) avec une détection en UV (détecteur à barrette de diodes Waters, W2996) et en diffusion de lumière (Waters W2424) dans le premier cas, et une détection en UV (détecteur à barrette de diodes) dans le second, et dans tous les cas un débit de 1 mL/min. Les deux chaînes sont équipées d'un dégazeur en ligne.

Les spectres UV des composés purs ont été enregistrés sur le détecteur à barrette de diodes Waters 2996.

2. Analyses RMN (Résonance Magnétique Nucléaire)

Les analyses de résonance magnétique nucléaire ont été effectuées pour les molécules issues de *P. acutangulum* et pour les huiles essentielles et terpènes sur un spectromètre Varian 400 MR équipé d'une sonde inverse 5 mm (Auto X PGF $^1\text{H}/^{15}\text{N}-^{13}\text{C}$). Les spectres protons ont été enregistrés à 400 MHz et les spectres carbones à 100,6 MHz. Dans le cas des quassinoides, les spectres ont été enregistrés à 300-500 MHz pour les spectres proton et à 75,4 ; 100,6 ou 125,8 MHz pour les spectres carbones. Les produits ont été dissous dans 700 µL d'acétone- d_6 ($\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$), d'acétonitrile- d_3 (CD_3CN), de chloroforme- d (CDCl_3) ou de méthanol- d_4 (CD_3OD) dans des tubes de 5 mm.

Dans les descriptions des spectres de RMN, s signifie singulet, d doublet, t triplet, m multiplet. Les constantes de couplage (J) sont mesurées en Hertz (Hz), et les déplacements chimiques (δ) sont mesurés en ppm par comparaison avec le déplacement chimique du tétraméthylsilane (TMS). L'attribution des différents signaux a été effectuée à l'aide des techniques de RMN à une dimension (^1H) de RMN à deux dimensions, par corrélation homonucléaire ^1H - ^1H COSY (COrrélation SpectroscopY) et NOESY (Nuclear Overhauser Effect SpectroscopY) et corrélation hétéronucléaire ^1H - ^{13}C HSQC (Heteronuclear Single Quantum Coherence) et HMBC (Heteronuclear Multiple Bond Correlation). Les spectres ont été traités avec le logiciel ACD-NMR.

3. Analyses GC/MS (Chromatographie en phase gazeuse / spectrométrie de masse) des huiles essentielles et terpènes commerciaux

Les analyses ont été effectuées grâce à un chromatographe Varian 450-GC équipé d'un passeur automatique d'échantillons de type Combipal et d'un spectromètre de masse MS240 (Varian Instruments, Sunnyvale, CA, USA). La colonne utilisée pour les analyses chromatographiques est une colonne apolaire Varian factorFOUR VF-5ms (30 m \times 0,25 mm de diamètre interne, épaisseur du film : 0,25 μm), équivalente à une phase 5% phényle 95% diméthylpolysiloxane et communément utilisée pour l'analyse des composés volatils. L'hélium a été utilisé comme gaz porteur à un flux constant de 1 ml/min.

La spectrométrie de masse a été réalisée en mode impact électronique (EI) à l'aide d'une trappe ionique équipée d'une source interne. Les molécules ont été bombardées avec un faisceau électronique d'une énergie de 70 eV. L'acquisition des données a été faite à partir de 4 min pour éviter le pic de solvant, pour une gamme de masse allant de 40 à 400 Da. Les températures des différentes parties du spectromètre ont été fixées à 200°C pour la trappe, 50°C pour le collecteur et 305°C pour la ligne de transfert.

Le programme choisi pour l'analyse GC/MS débute à une température 50°C, maintenue pendant 30 secondes, puis se poursuit par une montée en température de 25 min à 4°C/min pour arriver à 150°C, puis une seconde augmentation de 1,5°C/min pendant environ 7 minutes jusqu'à atteindre 175°C. Le programme se termine par une montée en température plus forte de 20°C par minute jusqu'à un palier de 300°C pendant 10 minutes, pour une durée totale d'analyse de 58,42 minutes. La température fixée pour l'injecteur était de 250°C. L'injection a été réalisée en mode split avec un rapport de division 1/50 durant toute la durée de l'analyse. Les huiles essentielles ont été diluées dans de l'hexane de qualité CLHP, et 1 μl de ces solution a été injecté pour chacune des analyses via le passeur automatique (Combipal). Les informations concernant la spectrométrie de masse sont celles décrites dans les données générales.

Pour le traitement des données chromatographiques, les indices de Kovats de chacune des molécules ont été calculés selon la formule suivante :

$$IK = 100\left(n + \frac{\log(t(x)) - \log(t(n))}{\log(t(N)) - \log(t(n))}\right)$$

Avec

t(x) : temps de rétention du composé à identifier

t(n) : temps de rétention de l'alcane ayant élué immédiatement avant le composé à identifier

t(N) : temps de rétention de l'alcane ayant élué immédiatement après le composé à identifier

n : nombre d'atomes de carbone de l'alcane ayant élué juste immédiatement avant le composé à identifier

Les indices de Kovats sont les temps de rétention relatifs des substances analysées par rapport à ceux d'une série d'alcanes linéaires injectés sur le même appareil (ici l'analyse a été effectuée à partir d'une série d'alcanes allant de C₈ à C₂₀).

4. Test de microdilution sur levures et champignons dermatophytes

Le test de microdilution a pour objectif de déterminer la concentration inhibitrice minimale (CIM) d'un extrait sur la croissance des souches de champignons dermatophytes et levures en milieu liquide. La méthode utilisée a été adaptée des normes M38-A et M27-A2 du NCCLS (actuellement CLSI, 2002, Méthode de référence pour tests de dilution en milieu liquide pour détermination de la sensibilité d'une thérapie antifongique de champignons filamenteux et levures, respectivement).

La manipulation s'effectue sur une plaque de 96 puits. Dans chacun des puits sont déposés 100 µl de RPMI. Dans les puits de la première colonne sont ensuite déposées les solutions des produits à tester (4 µl de solution d'huile essentielle à 50 mg/ml dans le DMSO complétés avec 96 µl de RPMI ou 1 µl de solution de molécule pure dans le DMSO complété avec 99 µl de RPMI), la concentration finale en produit dans ces puits étant de 500 µg/ml dans le cas des extraits, et 64 µg/ml dans le cas des produits purs. Les dilutions successives se font à partir de cette première colonne, jusqu'à la dixième (1 µg/ml pour les extraits, 0,1 µg/ml pour les molécules pures). Une solution d'inoculum (100 µl par puits) est ensuite déposée dans tous les puits de la première à la onzième colonne. Les dix premières colonnes de la plaque servent donc à mesurer la CIM (Concentration Inhibitrice Minimale), la onzième colonne est un témoin de la croissance du champignon, et la douzième, qui ne contient que du RPMI, un témoin pour vérifier la non-contamination du milieu.

Les solutions d'huile essentielles à tester sont préparées dans le DMSO à 50 mg/ml et stockées au réfrigérateur jusqu'à analyse. Des solutions-mères des antifongiques utilisés comme contrôles positifs dans le test (itraconazole et fluconazole) sont préparées dans le DMSO de façon à obtenir une concentration de 6,4 mg/ml pour l'itraconazole et 25,6 mg/ml pour le fluconazole. Les solutions-mères sont ensuite diluées dans le RPMI stérile afin d'obtenir une gamme de concentrations comprises entre 16 et 0,03 µg/ml pour l'itraconazole et entre 62 et 0,125 µg/ml pour le fluconazole dans les puits de la plaque (dépôt dans le premier puits de 100 µl d'une solution à 62 µg/ml dans le RPMI pour l'itraconazole et 100 µl d'une solution à 256 µg/ml dans le RPMI pour le fluconazole).

Conformément aux normes pour la détermination de la sensibilité des colonies vis-à-vis d'antifongiques ou autres substances que l'on désire tester, le milieu de culture utilisé est le RPMI-1640 (avec glutamine, sans bicarbonate et avec un indicateur au rouge de phénol), comme recommandé par le CLSI pour ce type de tests. La solution de milieu de culture est tamponnée par ajout d'une solution de MOPS (acide 3-(*N*-morpholino) propane sulfonique préparée dans l'eau distillée stérile à une concentration de 0,165 mol/l jusqu'à obtention d'un pH égal à 7. La solution tamponnée est ensuite filtrée sur une unité de filtration stérile équipée d'un filtre de porosité 0,22 µm et stockée au réfrigérateur.

Toutes les souches utilisées sont systématiquement repiquées 5 jours avant la manipulation. La solution mère de mycélium de chaque souche a été préparée par mise en suspension (agitation et vortex) des parties visibles des mycéliums dans de l'eau stérile. Toutes les solutions mères ont été ajustées visuellement au standard de turbidité McFarland 0,5 pour ensuite être diluées dans une proportion de 1:5 (v/v, dermatophytes) ou 1:1000 (v/v, levures) dans du RPMI stérile. Les plaques de microdilution contenant les extraits et les molécules commerciales antifongiques sont ensuite inoculées avec les solutions de mycélium (100 µl).

Les plaques de microdilution sont incubées à 32°C. Les résultats sont observés après 5 jours pour les champignons dermatophytes et après 2 jours pour les levures. La CIM est déterminée soit comme la concentration correspondante au dernier puits où la croissance fongique est absente (dans le cas des extraits et molécules pures), soit comme la concentration correspondante au dernier puits où la croissance fongique atteint au maximum 20% de la croissance fongique témoin (dans le cas des antifongiques).

Tous les essais ont été répétés en duplicat sur chaque plaque, et au moins en deux expérimentations distinctes. Les essais ayant donné des résultats différents ont été répétés jusqu'à obtenir une valeur fiable.

Matériel et méthodes relatif à *Quassia amara* L.

Pour les protocoles expérimentaux concernant l'étude de préparations phytothérapeutiques à base de feuilles de *Q. amara* L., se reporter directement aux parties expérimentales des publications insérées dans le Chapitre 2.

Matériel et méthodes relatif à *Psidium acutangulum* DC.

1. Récolte de *Psidium acutangulum* DC.

Plusieurs récoltes de rameaux (feuilles, tiges et éventuellement fruits) de *Psidium acutangulum* DC ont été effectuées par Marie Fleury (ethnobotaniste, MNHN) à Taluhwen (Haut-Maroni, Guyane Française). Pour des raisons de conservation du matériel végétal, les plantes ont été séchées avant utilisation.

- Un premier lot (numéro d'herbier MF2057) a été récolté le 30 août 2003, en saison sèche, puis séché et broyé. Les pieds de *Psidium* poussent en effet sur les îlots rocheux du fleuve. La récolte ne peut donc se faire qu'au moment de la décrue, les pieds étant noyés lorsque les eaux sont hautes.
- Un second lot MF2100 a été récolté le 10 juillet 2005, en début de saison sèche, lors de l'apparition des jeunes feuilles, puis séché et broyé.
- Un troisième lot MF2176 a été récolté le 16 février 2007 et séché. Dans ce dernier cas les rameaux (feuilles, tiges et fruits) ont été conservés tels quels, sans broyage préalable à la préparation du remède.

2. Préparation des remèdes et extraits

Les décoctions ont été préparées selon le protocole décrit par Marie Fleury dans son ouvrage sur les remèdes wayana (Fleury, 2007).

Etude du lot MF2057

Dans le cas du lot MF2057, 400 ml d'eau ont été portés à ébullition avec 20 g de matériel végétal pendant 2 heures, jusqu'à obtention d'un volume final de 200 ml de décoction (PSI 1). Après filtration, les extractions suivantes ont ensuite été réalisées (*Figure 67*) :

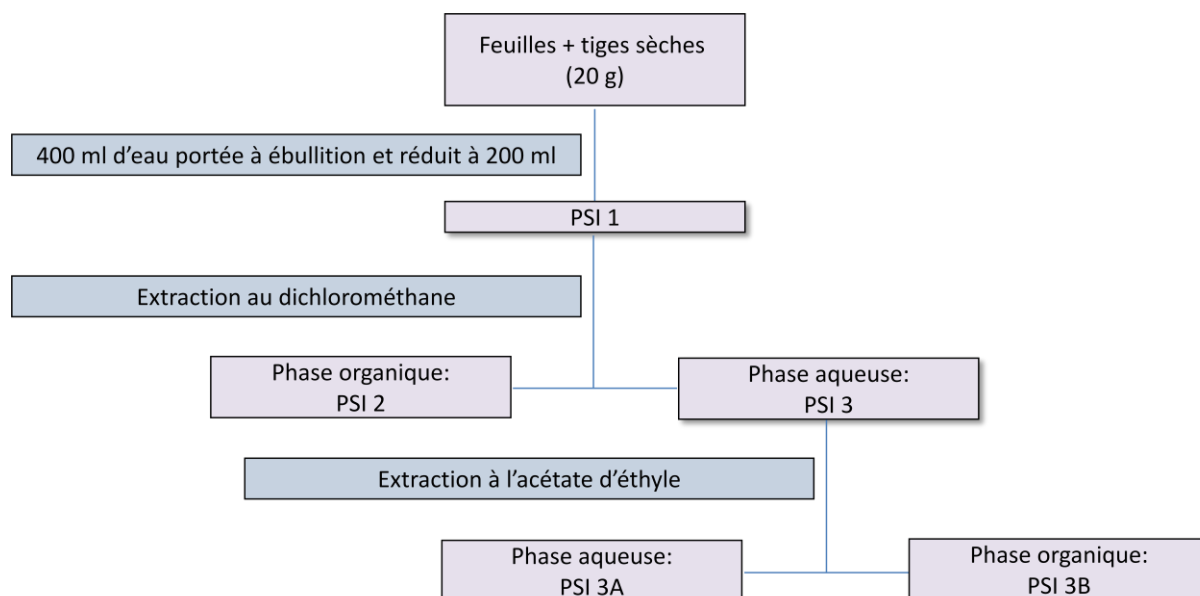


Figure 67 : Fractionnement de la décoction obtenue à partir du lot MF2057

Les extractions au dichlorométhane et à l'hexane ont été réalisées dans une ampoule à décanter par lavage de la phase aqueuse avec 4 fractions de 50 ml de solvant organique. Ces fractions organiques ont été regroupées, séchées sur sulfate de sodium anhydre, évaporées.

Les extraits ont ensuite été testés directement sur *Plasmodium falciparum* FcB1 chloroquino-résistant. Les résultats obtenus ont conduit à la poursuite du processus d'analyse et de fractionnement sur l'extrait PSI 3.

Comparaison des lots MF2057 et MF2100

Afin de comparer les compositions et les activités des deux lots disponibles, des extraits aux solvants du matériel végétal ont été réalisés selon les protocoles suivants :

- extraits au dichlorométhane (20 ml) sur environ 1 g de matériel végétal pesé exactement
- extraits à l'acétate d'éthyle (20 ml) sur environ 1 g de matériel végétal pesé exactement

Des décoctions des deux lots ont ensuite été réalisées à partir de 2 g de matériel végétal porté à ébullition dans 40 ml d'eau jusqu'à obtention de 20 ml de solution, ensuite extraite au dichlorométhane afin d'obtenir une phase organique et une phase aqueuse pour les essais suivants.

Etude du lot MF2176

Afin d'étudier l'influence de l'état de dessiccation du matériel végétal, deux décoctions ont été réalisées immédiatement après la récolte sur 20 g de matériel végétal, sec dans un cas, frais dans

l'autre, selon le même protocole que pour le lot MF2057. Après filtration et évaporation, les deux extraits secs ont été testés sur *P. falciparum*.

Une décoction a ensuite été réalisée à partir de 50,0 g de matériel végétal (feuilles et tiges sèches simplement cassées à la main) mises à bouillir dans un Erlenmeyer de 2 L dans environ 1 L d'eau (feuilles recouvertes) pendant 2 h jusqu'à obtention d'un volume final de 300 mL de décoction. Ce protocole correspond à celui décrit par Marie Fleury dans son ouvrage sur la pharmacopée wayana (Fleury, 2007). La décoction ainsi obtenue a été filtrée sur coton et stockée au réfrigérateur dans l'attente des extractions.

Des extractions successives ont été effectuées sur la décoction obtenue selon le schéma suivant (Figure 68):

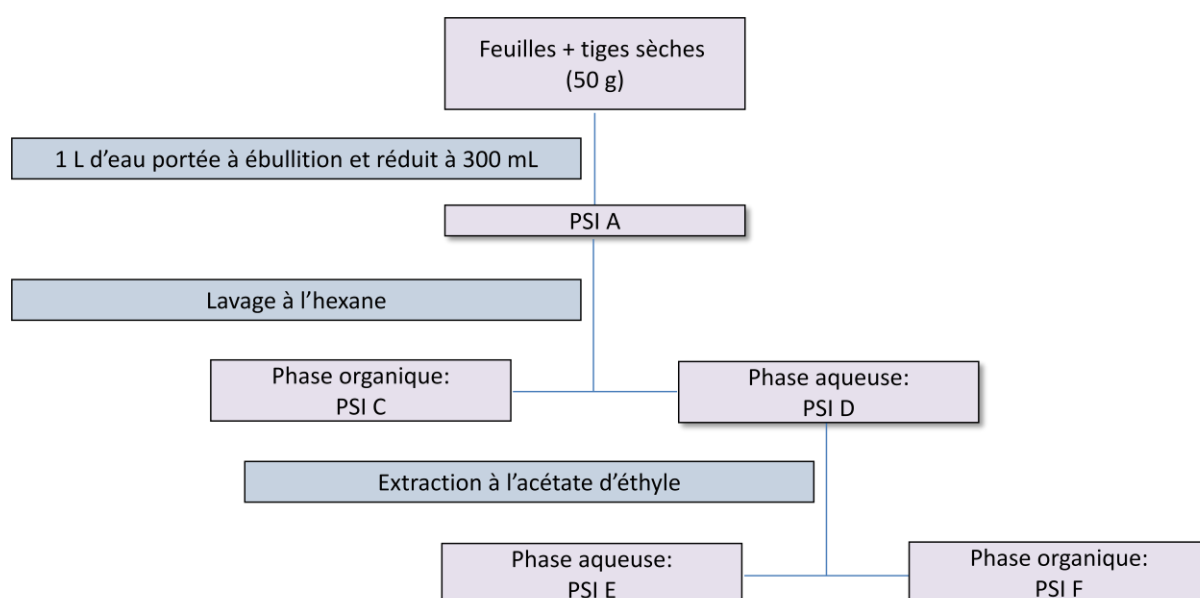


Figure 68 : Fractionnement du lot MF2176

Le lavage à l'hexane a été réalisé dans une ampoule à décanter par 3 ajouts successifs d'un volume de 80 mL de solvant de qualité analytique. La phase organique obtenue a été séchée sous pression réduite avec un évaporateur rotatif (Heidolph Laborota 4000), à une température inférieure à 37°C.

L'extraction à l'acétate d'éthyle a été effectuée dans une ampoule à décanter par 3 ajouts successifs d'un volume de 80 mL de solvant de qualité analytique. Les phases aqueuse et organique obtenues ont été séchées sous pression réduite avec un évaporateur rotatif (Heidolph Laborota 4000), à une température inférieure à 37°C.

Au vu des résultats obtenus lors des tests d'activité sur *Plasmodium falciparum* FcB1, le processus de fractionnement s'est poursuivi sur l'extrait PSI F.

3. Protocole des analyses et fractionnements effectués en CLHP sur *Psidium acutangulum* DC.

Etude du lot MF2057

La méthode de fractionnement retenue pour l'extrait au dichlorométhane PSI 2 issu du lot MF2057 est la suivante : un gradient eau - acétonitrile avec au départ un mélange 80:20 des deux solvants, pour aboutir à 100 % d'acétonitrile en 10 min, maintenu pendant 5 minutes supplémentaires. Le fractionnement a été réalisé sur une colonne de 25 cm de longueur, et la détection effectuée à 214 nm, cette valeur correspondant au maximum d'absorbance observé préalablement en CLHP analytique. Deux injections ont été réalisées avec des volumes de 500 et 600 µl d'une solution de l'extrait PSI 2 dans un mélange eau-acétonitrile 50:50 pour des questions de solubilité de l'extrait. La totalité de l'extrait PSI 2 a été injectée afin d'effectuer le fractionnement. Les fractions obtenues suite à cette séparation ont été analysées avec la même méthode (mais un débit de 1 ml/min au lieu de 15 ml/min précédemment), avec un volume de solution injecté de 5 µL. La détection en UV a été effectuée à 214 nm.

Comparaison des lots MF2057 et MF2100

Les analyses effectuées sur les extraits au solvant des lots MF2057 et MF2100 afin de comparer les profils des deux lots de plantes ont été effectuées avec la méthode décrite plus haut pour les fractions issues de PSI 2.

Etude du lot MF2176

Fractionnement de l'extrait à l'acétate d'éthyle PSI F

La mise au point de la méthode de fractionnement de l'extrait PSI F a été faite directement en mode semi-préparatif, sur une colonne de 15 cm de longueur. La détection a été effectuée à 214 nm, cette valeur correspondant au maximum d'absorbance observé préalablement en CLHP analytique. La méthode retenue consiste en une élution par un gradient linéaire en 20 minutes évoluant d'un mélange eau-acétonitrile 90:10 vers un mélange 50:50. Une élution en mode isocratique eau-acétonitrile 50:50 a ensuite été maintenue pendant 10 minutes afin de s'assurer de l'élution de tous les composés, même si aucun produit n'était visible à 214 nm au-delà de 20 min. Les injections ont été réalisées avec un volume de 1 mL d'une solution de l'extrait PSI F à 10 mg/mL dans un mélange

eau-acétonitrile 90:10. Plusieurs injections successives de ce mélange ont été effectuées afin d'obtenir des fractions en quantité suffisante.

Analyse des fractions obtenues

Les fractions obtenues suite à cette séparation ont été analysées, avec un volume de solution injectée de 5 µL. La détection en UV a été effectuée à 214 nm. La méthode d'analyse retenue consiste en un gradient linéaire d'un mélange eau-acétonitrile 90:10 évoluant en 30 minutes vers 100 % d'acétonitrile. Les fractions ont ensuite été rassemblées en fonction de leur temps de rétention et de leur maximum d'absorption en UV à 214 nm, puis évaporées. Quatorze fractions de A à N ont ainsi été obtenues.

Ces fractions A-N ont été à leur tour analysées par CLHP analytique et RMN (¹H) afin de confirmer ou non leur pureté. La détection UV en CLHP analytique a été dans ce cas effectuée à 214 et 354 nm, avec une élution en mode isocratique par un mélange eau-acétonitrile 83:17 pendant 20 minutes, suivie par un gradient linéaire allant jusqu'à un mélange eau-acétonitrile 50:50 pendant 10 minutes. 5 µL de solution de chacune des fractions reprises dans le solvant de départ ont été injectés.

Quatre fractions pures (A, DE, F et M) ont été identifiées par ces méthodes, et il a également été mis en évidence qu'une purification supplémentaire des fractions H, I et J (qui contenaient les mêmes molécules) permettrait d'isoler d'autres composés purs.

Sous-fractionnement de la fraction HIJ

Un nouveau fractionnement sur chaîne semi-préparative a donc été effectué suite à l'injection de 800 µL d'une solution de 11,4 mg des fractions H, I et J rassemblées et diluées dans 1 mL d'un mélange eau-acétonitrile 83:17. La méthode utilisée a consisté en une élution en mode isocratique par un mélange eau-acétonitrile 83:17 pendant 20 minutes, suivie par un gradient linéaire allant jusqu'à un mélange eau-acétonitrile 50:50 en 5 minutes. Les fractions obtenues ont été évaporées puis analysées en CLHP analytique avec la même méthode que celle employée pour les fractions A-N, et éventuellement en RMN (¹H). Quatre nouvelles molécules pures ont ainsi été obtenues: HIJ69-73, HIJ87-89, HIJ91 et HIJ93. Huit molécules pures ont donc été au total isolées de l'extrait PSI F.

4. Mesure du pouvoir rotatoire des composés purs isolés

Les mesures ont été effectuées sur un appareil Perkin Elmer 241 à la longueur d'onde de la raie D du sodium (589 nm) dans une cuve de contenance 1 mL et de trajet optique 10 cm. La température fixée pour les mesures a été de 27 °C. Le solvant utilisé était le méthanol, sauf dans le

cas de la catéchine, diluée dans un mélange eau-acétone 50:50. Les conditions expérimentales pour chacune des molécules étudiées sont détaillées dans le tableau suivant (*Tableau 19*) :

Tableau 19 : Conditions expérimentales pour la mesure des pouvoirs rotatoires des molécules pures isolées de l'extrait à l'acétate d'éthyle PSI F de la décoction de *P. acutangulum*

N°	Molécule	Masse (mg)	Volume de solvant pour la dilution (mL)	C (g/100mL)	Mesure	[α] _D	Remarque
1	catéchine	0,45	1,20	0,038	0,001	3	Non significatif
2	n.i.	1,70	1,20	0,142	0,450	318	
3	quercitine-3-O-b-D-xylofuranoside	2,50	1,20	0,208	0,800	384	
4	reynoutrine	0,50	1,20	0,042	-0,003	-7	Non significatif
5	guaijaverine	0,40	1,20	0,033	-0,007	-21	Non significatif
6	avicularine	0,80	1,20	0,067	-0,037	-56	
7	quercitrine	0,40	1,20	0,033	-0,004	-12	Non significatif
8	n.i.	1,10	1,20	0,092	-0,037	-40	

5. Tests d'activité sur le stade érythrocytaire de cultures de *Plasmodium falciparum* in vitro

Trager et Jensen (1976) ont décrit un protocole pour la culture des stades érythrocytaires de *P. falciparum* in vitro (Trager et Jensen, 1976). Desjardins *et al.* (Desjardins *et al.*, 1979) ont proposé une miniaturisation et semi-automatisation permettant la culture sur des plaques de microtitration et la quantification de la croissance parasitaire par l'incorporation d'un précurseur d'acides nucléiques radio-marqué. Cette technique nous a permis de déterminer l'activité antipaludique des fractions et des composés isolés. Elle est aussi le point de départ des techniques de détermination du stade sensible et de combinaison de drogues.

Les essais réalisés sur les lots MF2057 et MF2100 l'ont été par le Dr Eric Deharo (UMR 152 IRD/UPS) et le Dr Stéphane Bertani (MNHN) au laboratoire de parasitologie de l'Institut Pasteur de la Guyane.

Entretien de la culture de *Plasmodium falciparum* in vitro

P. falciparum est maintenu en culture dans du milieu RPMI 1640 (Sigma®) avec 10 mM de glucose et 25 mM de bicarbonate de sodium, supplémenté de 10 % de sérum humain (Marcopharma™) décomplémenté, et dans un environnement à 37°C et 5 % de CO₂. Le milieu est changé quotidiennement et l'hématocrite maintenu à 10% avec des globules rouges sains. La parasitémie de la culture (qui ne doit pas excéder 5 %) est contrôlée quotidiennement à l'aide d'un frottis coloré au Giemsa HEMATOCOLOR® (Merck™).

Test de chimiosensibilité de Plasmodium falciparum

La technique utilisée est la méthode du test de microdilution mise au point par Desjardin *et al.* (Desjardins *et al.*, 1979) et modifiée par Le Bras et Deloron (Le Bras et Deloron, 1983). Ce test permet d'évaluer la concentration d'un composé déterminant 50 % d'inhibition de la croissance parasitaire (CI₅₀) par rapport à un contrôle sans drogue. Le principe du test est la mise en culture des parasites pendant 42 heures en présence de différentes concentrations d'un composé à tester, dans un milieu contenant de l'hypoxanthine tritiée (molécule-précurseur de la thymidine). La radioactivité incorporée est mesurée, permettant une estimation de la vitalité des parasites.

Une culture parasitaire est déposée dans une plaque 96 puits (1 % de parasitémie; 2,5 % d'hématocrite; 1,44 µCi/ml d'hypoxanthine tritiée (Amersham™); volume de 200 µl). Des dilutions sériées de composés à tester sont déposées dans les puits (en volume de 50 µl), et la plaque est incubée pendant 42h à 37°C et 5% de CO₂. A la fin de l'incubation, la plaque est congelée-décongelée afin de lyser les globules rouges et l'ADN parasitaire est récolté sur un filtre en fibres de verre. La radioactivité incorporée est évaluée à l'aide d'un compteur à scintillation liquide (modèle MicroBeta® Trilux; Wallac 1450; logiciel version 4.1). La CI₅₀ est ensuite déterminée à l'aide d'un programme log/Probit.

Les essais réalisés sur le lot MF2176 l'ont été par les équipes du Dr Valérie Jullian et du Pr Alexis Valentin à l'UMR 152 (IRD/UPS) à Toulouse.

Entretien de la culture de Plasmodium falciparum in vitro

Les globules rouges parasités sont cultivés dans des flacons de 25 cm³ contenant 8,5 ml de milieu RPMI 1640, 0,7 ml de SH, 0,1 ml de L-glutamine et 400 µl de sang parasité (hématocrite = 4 %). La parasitémie est maintenue entre 0,7 et 3 % (autour de 2 %). Les ajustements de parasitémie sont réalisés avec des hématies saines lavées.

Les cultures sont incubées dans une étuve à 37°C, avec 5 % de CO₂, et une humidité autour de 90 %. Le milieu est renouvelé quotidiennement et un contrôle microscopique (x 1000) de la parasitémie est effectué par la réalisation d'un frottis sanguin fixé au méthanol, coloré au Giemsa, afin de vérifier le bon état de la culture.

Test de chimiosensibilité de *Plasmodium falciparum*

Les souches de *Plasmodium falciparum* ont été travaillées avec une parasitémie ajustée entre 1 et 2 % dans les conditions de cultures décrites précédemment. Le test s'effectue en microplaques de 96 puits à raison de 200 µl par cupule en triples essais. Plusieurs témoins sont également préparés (témoin de croissance et témoin négatif) :

- Puits test: 100µl de solution à tester + 100 µl de suspension globulaire (RPMI, SH 10%, L-Glutamine 1%, GRP hématocrite 1,5%),
- Témoin de croissance (sans produit): 100 µl RPMI + 100 µl suspension globulaire (RPMI, SH 10%, L-Glutamine 1%, GRP hématocrite 1,5%),
- Témoin négatif (hématies saines): 100 µl RPMI + 100 µl suspension globulaire (RPMI, SH 10%, L-Glutamine 1%, GRS hématocrite 1,5%),

Pour les microtests, les différentes concentrations de composés à tester sur les formes jeunes en anneau des stades sanguins de *Plasmodium falciparum* (obtenues par synchronisation avec 5 % D-sorbitol, voir annexe 3) sont mises à agir. Après 24 h de croissance sont ajoutés au milieu 0,25 µCi/puits d'hypoxanthine tritiée (l'hypoxanthine est un précurseur de l'acide nucléique, donc un marqueur de croissance). L'incubation a été poursuivie jusqu'à la 48^{ème} heure, puis les plaques ont été congelées à -18°C. Elles ont été ensuite décongelées à température ambiante. Cette étape de congélation/décongélation permet une lyse des globules rouges ce qui entraîne la libération des parasites dans le milieu.

Détermination de la parasitémie

Une fois les plaques décongelées, les parasites ont été collectés sur un papier filtre au moyen d'un collecteur de cellules. Le papier-filtre est ensuite séché dans un four à chaleur sèche puis placé dans un sac spécial (Sample Bag, Wallac) contenant 5 ml de liquide de scintillation (BetaPlate Scint de Wallac). Le compteur Wallac Microbeta 1450 possède une interface de chargement robotisée, avec des cassettes spéciales. La radioactivité collectée sur chaque puits est alors mesurée, elle est proportionnelle à la croissance parasitaire.

Détermination des Concentrations Inhibitrices 50% (CI₅₀)

La lecture de radioactivité permet de déterminer (par analyse de régression linéaire) la Concentration Inhibitrice 50 (CI₅₀) qui est définie comme la concentration de produit nécessaire pour diminuer de 50% la parasitémie d'une culture mise en contact avec le produit à tester par rapport à la parasitémie d'une culture témoin de croissance (sans produit).

Chaque parasitémie (exprimée en %) rapportée au témoin de culture, en fonction des concentrations de produit, nous permet d'établir une relation graphique appelée "courbe effet-dose". Grâce à cette courbe et par régression linéaire, nous pouvons déterminer la CI_{50} du produit testé.

6. Evaluation de la toxicité sur lignée cellulaire VERO

Les cellules VERO (lignée épithéliale de rein de singe vert) sont cultivées dans un milieu de culture de type EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) contenant 2 mM de L-glutamine, 2 mM d'acides aminés non essentiels, 2 mM de pyruvate de sodium, et supplémenté avec 10 % de sérum fœtal bovin. Toutes les expériences sont réalisées en utilisant des cellules en phase de croissance exponentielle. Après ajout de trypsine, les cellules sont remises en suspension dans le milieu de culture et distribuées dans une plaque de 96 puits à raison de 20 000 cellules par puits. Après 24 h le milieu de culture est remplacé par du milieu frais contenant les molécules à testées diluées à des concentrations allant de 100 à 0,01 µg/ml. Les plaques sont incubées à $37^{\circ}\text{C} \pm 1^{\circ}\text{C}$ et 5 % (CO_2) pendant 24 h, délai au bout duquel 20 µl d'hypoxanthine triciée sont ajoutés dans chaque puits. Les plaques sont ensuite de nouveau incubées pendant 24 h supplémentaires. La réaction est arrêtée par congélation des plaques à -20°C . Les plaques sont ensuite décongelées et le contenu de chaque puits récupéré. Après ajout de Betaplate Scint (SC/9200/21, 1205/440) un comptage de la radioactivité est effectué, et la CI_{50} (concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire) déterminée graphiquement suivant la courbe dose-réponse obtenue. Le SDS (Sodium Dodecyl Sulfate) 10 % (v/v) dans l'eau est utilisé comme contrôle.

Ces tests ont été effectués au sein de l'UMR 152 IRD/UPS (Pharmacologie et pharmacochimie pour le développement - PHARMA-DEV) à Toulouse (Dr Valérie Jullian, Pr Alexis Valentin).

Matériel et méthodes relatif à *Otacanthus azureus* (Linden)

Ronse

1. Récolte du matériel végétal et obtention de l'huile essentielle

Pour cette étude, deux lots d'huile essentielle ont été étudiés. Dans les deux cas, le matériel végétal a été récolté dans un jardin d'ornement (carbet KLR), au point kilométrique 10 de la piste de Bélizon, en Guyane française (coordonnées GPS : 52°22'W, 4°18'N). Un échantillon d'herbier a été déposé à l'Herbier de Guyane (CAY) par le collecteur, Pierre Silland.

Les hydrodistillations ont été effectuées dans un hydrodistillateur du laboratoire permettant de travailler sur des quantités de plantes allant de 1 kg à 2,5 kg pour une seule distillation. Les lots ont été distillés immédiatement après récolte, le premier (PSN43) en mars 2007 et le second (Phi19) en mars 2008.

2. Fractionnement de l'huile essentielle par chromatographie sur colonne de silice

Le fractionnement de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* a été réalisé sur colonne de silice enrichie en nitrate d'argent (AgNO_3 , 1 %). L'ajout de nitrate d'argent permet d'obtenir une meilleure séparation en jouant sur le nombre d'insaturations portées par les molécules (Cavalli, 2002).

L'adsorbant choisi est une silice fine de granulométrie 40-60 μm . La silice (90 g) a été ajoutée à une solution de nitrate d'argent dans l'éthanol (0,9 g dans 250 à 300 ml de solvant jusqu'à dissolution complète du nitrate d'argent). L'excès de solvant est ensuite évaporé à l'évaporateur rotatif avec un chauffage modéré. La silice enrichie est ensuite séchée à l'étuve (120°C, 6 heures) jusqu'à obtention d'un gel de couleur grise.

Environ 1,5 g d'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* ont ensuite été élués par un gradient hexane / dichlorométhane / acide acétique (2 %) selon les proportions suivantes : 100/0 ; 99/1 ; 95/5 ; 90/10 ; 80/20 ; 70/30 ; 60/40 ; 50/50 ; 49/51 ; 48/52 ; 47/53 ; 46/54 ; 45/55 ; 44/56 ; 43/57 ; 42/58 ; 41/59 ; 40/60 ; 35/65 ; 30/70 ; 25/75 ; 20/80 ; 10/90 ; 0/100. Ces mélanges ont été choisis suite aux résultats obtenus pour les chromatographies sur couche mince (CCM) effectuées préalablement sur l'huile brute. 200 fractions ont ainsi été obtenues, et analysées à la fois par CCM, ainsi que par chromatographie en phase gaz pour certaines d'entre elle afin d'affiner leur regroupement.

Ce regroupement a conduit à l'obtention de 16 fractions desquelles le solvant a été évaporé sans chauffer afin de préserver autant que possible les molécules isolées. Les fractions ont été rassemblées de la façon suivante : F1 : Oc 5 ; F2 : Oc 6 ; F3 : Oc 7-10 ; F4 : Oc 11-22 ; F5 : Oc 23-31 ; F6 : Oc 32 ; F7 : Oc 36-39 ; F8 : Oc 40-42 ; F9 : Oc 43-48 ; F10 : Oc 50-53 ; F11 : Oc 54-56 ; F12 : Oc 57-60 ; F13 : Oc 61-70 ; F14 : Oc 71-75 ; F15 : Oc 76-85 ; F16 : Oc 86-200. Les résultats de l'analyse GC/MS de ces fractions sont présentés en annexe (Annexe 23).

Le rendement de la séparation a été de 77,3 % avec une masse de produits obtenus de 1,16 g.

3. Evaluation de la toxicité sur lignée cellulaire VERO

Les cellules VERO (lignée épithéliale de rein de singe vert) sont cultivées dans un milieu de culture de type EMEM (Eagle's Minimal Essential Medium) contenant 2 mM de L-glutamine, 2 mM d'acides aminés non essentiels, 2 mM de pyruvate de sodium, et supplémenté avec 10 % de sérum foetal bovin. Toutes les expériences sont réalisées en utilisant des cellules en phase de croissance exponentielle. Pour la manipulation, les cellules sont comptées à l'hémacytomètre puis distribuées dans une plaque de 96 puits à raison de 50 000 cellules par puits. Les composés à évaluer sont ajoutés à concentration décroissante (de 100 à 0,01 µg/ml) et incubés à 37°C ±1°C et 5% (CO₂). Après 48 h d'incubation, du MTT (bromure de 3(4,5-diMéthylThiazol-2-yl)-2,5-diphényl-Tétrazolium, Sigma) est rajouté à hauteur de 25 µL de MTT (5 mg/mL) dans chaque puit durant une période de 4 h. La réaction est arrêtée par ajout de 100 µL d'une solution 50/50 (v/v) d'acide acétique (1 %) et éthanol (96 %) contenant du SDS (sodium dodécyl sulfate) à 20 % (m/v). Les densités optiques (DO) sont lues après 30 minutes d'incubation à température ambiante sur un lecteur de microplaques-ELISA (modèle 3550, Bio-Rad) à 595 nm.

La CI₅₀ (concentration inhibant 50% de la croissance cellulaire) est déterminée en fonction du pourcentage d'inhibition de la viabilité de la cellule aux concentrations de composés donnés selon la formule suivante :

$$\text{Pourcentage d'inhibition} = \left(\frac{\text{DO contrôle} - \text{DO composés}}{\text{DO contrôle}} \right) \times 100$$

Avec DO : densité optique

La CI₅₀ est calculée par Probit.

Ces tests ont été effectués au sein de l'UMR 152 IRD/UPS (Pharmacologie et pharmacochimie pour le développement - PHARMA-DEV) à Lima (Dr Eric Deharo).

4. Tests de synergie entre l'huile essentielle et des antifongiques azolés (itraconazole, fluconazole, cétoconazole) sur levures et champignons dermatophytes

Dans ce test, deux produits à évaluer en combinaison sont déposés en dilutions séries croisées sur une plaque de 96 puits selon le schéma de plaque présenté ci-dessous (Figure 69):

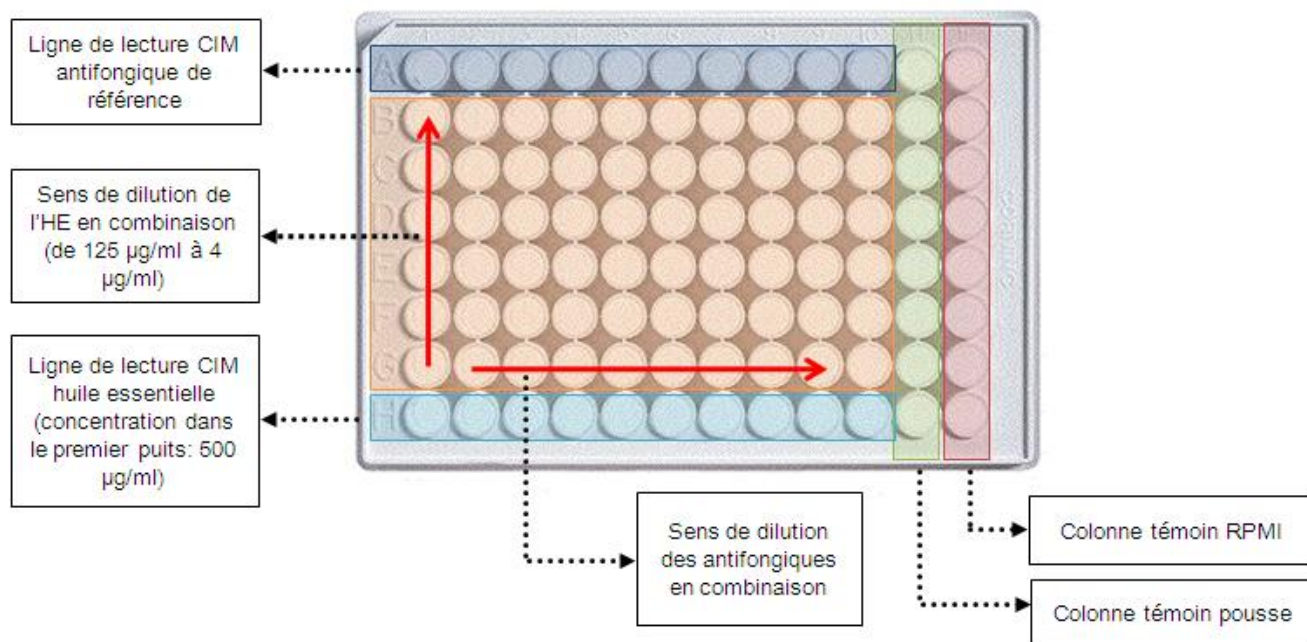


Figure 69 : Schéma de plaque utilisée pour les essais de combinaison entre l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* et les antifongiques azolés

Le mode opératoire de ce test est basé sur celui du test de microdilution décrit dans les données générales du chapitre Matériel et Méthodes (pages 169-170).

Dans tous les puits sont d'abord déposés 100 µl de RPMI stérile. La solution d'antifongique est ensuite déposée dans le premier puits des lignes A (antifongique seul, détermination de la concentration inhibitrice minimale) à G. Pour l'itraconazole, la concentration dans le premier puits est $C = 16 \mu\text{g/ml}$. Dans le premier puits de la ligne A sera donc déposée une solution d'itraconazole dans le RPMI (100 µl) de concentration 64 µg/ml ($4 \times C$) et des lignes B à G de concentration 128 µg/ml ($8 \times C$) (100 µl également). Pour le fluconazole, la concentration de départ est fixée à 64 µg/ml, et à 16 µg/ml pour le cétoconazole. Les dilutions dans le sens horizontal sont ensuite effectuées sur les lignes A-G des colonnes 1 à 10. Dans le dernier puits, les concentrations en antifongiques sont donc de 0,03 µg/ml pour l'itraconazole et le cétoconazole, et de 0,125 µg/ml pour le fluconazole.

La solution d'huile essentielle est ensuite déposée, à une concentration de 2 mg/ml dans le DMSO (4 µl de solution à 50 mg/ml dans le DMSO + 96 µl de RPMI) pour le premier puits de la ligne

H (détermination de la CIM, concentration de départ dans le premier puits de 500 µg/ml) et à une concentration de 1 mg/ml dans les puits des lignes B à G de la colonne 1 (2 µl de solution à 50 mg/ml dans le DMSO + 98 µl de RPMI), afin d'obtenir une concentration de départ de 125 µg/ml pour l'huile essentielle en combinaison. Les dilutions verticales sont ensuite effectuées des lignes B à G, et la dilution horizontale pour la détermination de la CIM de l'huile essentielle effectuée ligne H.

Les plaques sont ensuite inoculées avec les solutions de champignons (100 µl d'inoculum par puits) selon le même protocole que pour la microdilution. La lecture des résultats se fait par le repérage des puits dans lesquels une croissance fongique a eu lieu, afin de déterminer les CIM des produits purs et des mélanges.

Les résultats sont analysés par le calcul des concentrations inhibitrices fractionnées (CIF) et des indices de CIF, définis comme suit :

$$CIF \text{ de l'huile} = \left(\frac{\text{MIC de l'huile dans la combinaison la plus efficace avec l'antifongique}}{\text{MIC de l'huile seule}} \right)$$

$$CIF \text{ de l'antifongique} = \left(\frac{\text{MIC de l'antifongique dans la combinaison la plus efficace avec l'huile}}{\text{MIC de l'antifongique seul}} \right)$$

Les résultats sont également analysés selon la méthode des isobogrammes (*Figure 71*) : les CIM de chaque combinaison entre les deux produits sont calculées et tracées graphiquement afin de déterminer l'aspect de la combinaison. Dans le cas où les produits se substituent mutuellement, la courbe tracée est une diagonale, qui montre un effet additif. Quand les deux produits accentuent mutuellement leurs activités respectives, la courbe qui en résulte se rapproche de l'origine des deux axes et prend un aspect concave : il s'agit dans ce cas d'un effet de synergie. A l'inverse lorsque la courbe est convexe et se situe au-dessus de la diagonale, l'inhibition mutuelle des activités indique que l'on est en présence d'antagonisme.

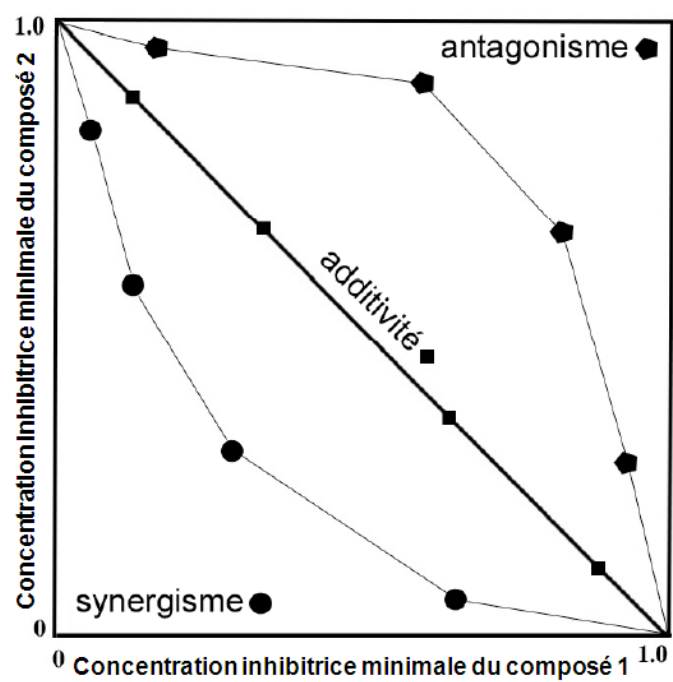


Figure 70 : Représentation graphique des isobogrammes. Les différents effets combinatoires pouvant être observés (additivité : carré ; synergisme : rond ; antagonisme : pentagone) sont indiqués.

Matériel et méthodes relatif à l'étude des huiles essentielles

1. Préparation des huiles essentielles

Pour les huiles sélectionnées, les hydrodistillations ont été effectuées dans un hydrodistillateur du laboratoire permettant de travailler sur des quantités de plantes allant de 1 kg à 2,5 kg pour une seule distillation. Suivant l'espèce étudiée, différentes parties du matériel végétal frais (plante entière, feuilles, bois, écorce, fruits) frais ont été lavées, coupées et soumises à la distillation.

2. Test de diffusion en cavité (Figure 71)

L'évaluation de l'activité antifongique des huiles essentielle par diffusion en cavité (ou perforation en agar) est réalisée dans des boîtes de Pétri de diamètre 14 cm dans lesquelles a été distribuée une solution de milieu de culture gélosé, en l'occurrence un mélange préalablement stérilisé de dextrose de pomme de terre et d'agar (potato dextrose agar ou PDA) dans le cas des levures et champignons dermatophytes, à raison de 50 ml de solution par boîte. Les boîtes de Pétri sont conservées au réfrigérateur jusqu'au moment de la manipulation.

Les inocula sont préparés en versant directement de l'eau distillée stérile directement sur la surface gélosée d'un tube de culture contenant la souche étudiée dans le cas des champignons filamenteux (*M. canis*, *T. mentagrophytes* et *M. gypseum*), ainsi que pour la levure *C. krusei*. La surface du milieu de culture est ensuite frottée délicatement avec une anse de platine de façon à mettre le mycélium en suspension dans la solution. Dans le cas de *C. parapsilosis*, un petit fragment de mycélium est prélevé directement au bout de l'anse de platine et déposé dans l'eau distillée stérile. Les solutions sont ensuite homogénéisées au vortex. Les inocula sont enfin ajustés au standard de turbidité McFarland 2, et déposés de façon homogène à l'aide d'un coton-tige stérile sur toute la surface de la boîte de Pétri préalablement préparée. L'excès d'eau des suspensions a été évaporé sous la hotte.

Les extraits sont préparés par pesée des huiles essentielles et ajout du volume nécessaire de DMSO stérile pour obtenir des solutions à 20 et 100 mg/ml. Des cavités (diamètre 6 mm) sont perforées à l'aide d'une canule en verre stérile sur les milieux de culture ensemencés. Les solutions d'extrait (50 µl) sont ensuite déposées dans chacune des cavités, ainsi que 50 µl de DMSO stérile utilisé comme témoin négatif dans le cadre de ces essais. Les boîtes sont enfin scellées avec du parafilm et incubées à l'étuve à 32°C jusqu'à ce que la croissance fongique permette de mesurer visuellement une zone d'inhibition de croissance autour de chaque cavité. Une boîte témoin a

également été préparée afin de vérifier que la croissance du champignon en l'absence de produits à tester est bien homogène sur la surface de la boîte à la fin du temps d'incubation. Les résultats sont ensuite reportés de façon qualitative, la présence d'une zone d'inhibition étant comptée comme un résultat positif, et l'absence de zone d'inhibition comme un résultat négatif. Chaque extrait a été testé en duplicat.

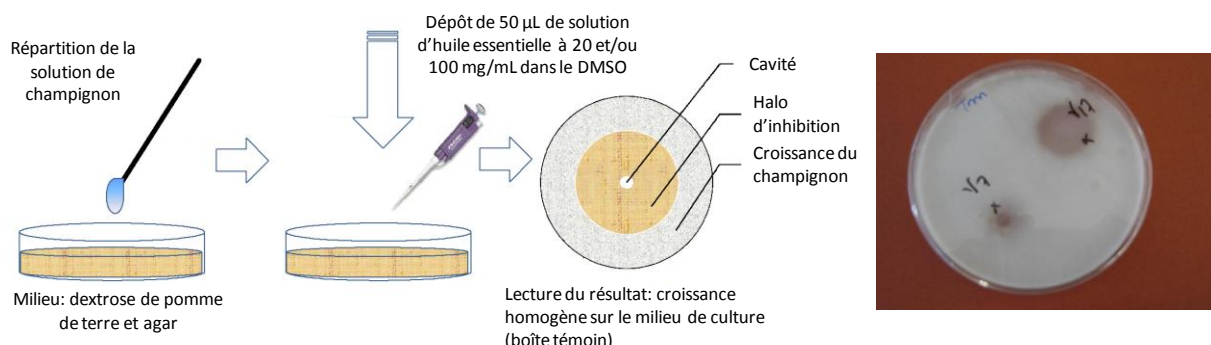


Figure 71 : Schéma de principe du test de diffusion en cavité (perforation en agar) à gauche et photographie d'une boîte de Pétri inoculée avec de l'huile essentielle de *P. heptaphyllum* (souche *T. mentagrophytes*) après incubation (à droite)

3. Etude métabolomique des données GC/MS obtenues pour les huiles essentielles

Conversion des données

Les données obtenues après analyses GC/MS sont récupérées sous le format .sms utilisé par Varian, et transformées par le logiciel GC and GCMS File Translator au format NetCDF (.cdf) afin de pouvoir être traitées ensuite par MZmine. Cette étape permet de réunir l'ensemble des données obtenues lors de chaque analyse en un seul fichier de données brutes.

Traitement des données sous MZmine 2

Les données sont ensuite importées au format NetCDF dans le logiciel MZmine 2.2 via la commande **Raw data methods > Raw data import**. Ces données sont ensuite sauveées sous forme de projet avant traitement dans leur intégralité (mode **Run batch**). Les étapes successives de l'analyse sont donc programmées sur l'ensemble des données du projet, la première étape étant réalisée sur les données brutes importées et les analyses suivantes se faisant sur le résultat obtenu à l'issue de l'étape immédiatement précédente. Les paramètres indiqués pour les différentes étapes ont été choisis lors de la mise au point de la méthode sur 60 huiles commerciales (Aroma-Zone). Toutes ces huiles essentielles ont été analysées par GC/MS, certaines injections étant faites en duplicat, l'objectif

du réglage des paramètres étant que les points identiques se retrouvent bien au même endroit dans le graphique de l'ACP (analyse en composantes principales).

Les actions suivantes sont ainsi programmées :

- **Filtering**

Un premier filtre est appliqué à l'intégralité des fichiers de données brutes afin de réduire le bruit de fond des analyses importées. Le type de filtre choisi est **Scan by scan filtering** avec application d'un filtre de Savitsky-Golay, avec comme paramètre **number of data points = 5**. Ce type de filtre fonctionne par l'application d'une régression polynômiale sur une série de valeurs afin de déterminer pour chacun des points une valeur filtrée.

- **Chromatogram builder**

Il s'agit du module principal pour la détection des pics dans le logiciel MZMine 2. L'objectif est de créer une liste de masses uniques formant des chromatogrammes continus dans le fichier de données brutes. Ceux-ci seront ensuite déconvolués en pics individuels à la fin de l'analyse. Trois étapes sont incluses dans ce module : la détection en masse, l'application d'un filtre et la construction du chromatogramme. La détection en masse s'effectue ici en mode **Centroid**, pour lequel chaque signal situé au-dessus du niveau de bruit limite est considéré comme un ion détecté. Cette méthode permet de combiner les diverses valeurs de m/z obtenues pour un pic donné en une donnée unique caractérisée par une seule valeur de m/z , le centre de gravité de l'ensemble des valeurs et de leurs intensités respectives. Le niveau de bruit est ici fixé à $1,00 \cdot 10^3$. Le filtre appliqué ensuite est du type **FTML shoulder peaks filter**. L'utilité de ce type de filtre est de supprimer, ou au moins réduire le bruit analytique ou les variations de ligne de base des chromatogrammes obtenus. La résolution en masse, qui définit la largeur du modèle et doit donc être équivalente à la résolution des pics dans les données brutes, est fixée à 400. La fonction de construction des pics est choisie de type gaussien (**Gaussian**). Lorsque la détection en masse et la filtration sont terminées, les valeurs de m/z de chaque scan doivent être connectées pour former des chromatogrammes. Cette transformation s'effectue en mode **Highest data point**, c'est-à-dire que les données issues de la liste des ions générée précédemment sont traitées par ordre d'intensité décroissante. Les paramètres sont les suivants : **min time span 0:10** (réglé en fonction de la durée standard d'un pic des chromatogrammes sélectionnés, correspond à la durée minimale durant laquelle le même ion est considéré), **min height $2,00 \cdot 10^4$** (intensité minimum du plus haut point du chromatogramme), **m/z tolerance 0,100 m/z** (différence maximum entre deux valeurs de m/z de scans consécutifs pour être considérées dans le même chromatogramme).

- **Chromatogram deconvolution**

Les chromatogrammes obtenus lors de la première étape sont ensuite déconvolués en pics individuels. Cette étape permet, dans le cas de méthodes d'ionisation conduisant par exemple à des fragments (comme dans le cas de l'impact électronique) de regrouper, en utilisant à la fois le profil spectral et le profil chromatographique, les ions provenant d'une même molécule. La méthode choisie ici est **Baseline cut-off**. Elle consiste à couper dans un premier temps la partie inférieure du chromatogramme en dessous d'une ligne de base de niveau spécifié par l'utilisateur. Les pics restants au dessus de cette ligne de base sont reconnus comme tels s'ils respectent les critères fixés en termes de hauteur et durée minimales. Les paramètres choisis ici sont **min peak height 10²**, **min peak duration 0:10** et **baseline level 10²**.

- **Join aligner**

Malgré les avancées techniques dans le domaine de la chromatographie, de légères variations entre les temps de rétention sont toujours observables pour une même molécule dans deux injections différentes. Un alignement des pics est donc nécessaire afin de corriger ces variations et de permettre de combiner efficacement les données obtenues au cours d'une série d'analyses. L'alignement s'effectue également sur les valeurs de m/z de chaque métabolite. La méthode d'alignement utilisée ici est le **Join aligner**, qui compare les pics obtenus pour les différentes analyses en fonction d'un score de correspondance calculé à partir de la masse des ions et du temps de rétention de chaque pic, ainsi qu'en fonction des paramètres fixés lors de l'analyse. Ces paramètres sont les suivants : **m/z tolerance 0,200** (écart acceptable pour que deux pics soient alignés), **weight for m/z 10** (poids assigné aux différences de m/z lors du calcul du score de correspondance. Si les deux valeurs correspondent parfaitement, le score reçoit le poids total), **retention time tolerance type : absolute** (différence maximale entre deux temps de rétention en valeur absolue), **absolute RT tolerance 2:00** (différence absolue maximum entre deux temps de rétention), **relative RT tolerance : 15 %**, **weight for RT : 10** (même définition que pour les valeurs de m/z), **require same charge state : no**, **required same ID : yes** (dans le cas où l'identité des pics est vérifiée), **compare isotope pattern : no**, **isotope pattern score : 15 %**.

- **Linear normalization**

La dernière étape du traitement des données avant analyse est leur normalisation. Le but est de supprimer les variations inter-échantillons. La normalisation linéaire divise l'aire (ou la hauteur) de chaque pic par un facteur de normalisation déterminé en fonction des paramètres spécifiés (et donc indépendamment pour chacun des fichiers traités). Le paramètre (**peak measurement type**) choisi ici est l'aire du pic, et la normalisation (**normalization type**) s'effectue en fonction du signal total.

Ce traitement étant effectué, les données sont exportées sous le format texte .csv vers Excel pour un traitement statistique manuel.

Traitement des données sous Excel 2010

Une fois les données exportées de MZmine2.2 sous le format .csv, elles sont importées dans Excel via le module d'importation des données externes dans l'onglet **Données > Données externes > A partir du texte**. Pour réussir les importations, il est nécessaire de spécifier les caractéristiques suivantes :

- Les données sont délimitées dans le fichier .csv par des virgules et non par des largeurs fixes.
- L'import doit débiter à la ligne 1.
- L'origine du fichier doit être spécifiée comme **1250 Europe centrale (windows)**.
- Il est nécessaire de spécifier que les séparateurs contenus dans les données sont les tabulations et les virgules. L'identificateur de texte est le guillemet (« »).
- Le format d'importation des données est en colonne.
- Dans le module avancé, pour les paramètres utilisés dans la reconnaissance des données numériques il est nécessaire de spécifier que le séparateur de décimale est le point et non la virgule.
- En dernier lieu, il convient de spécifier l'endroit à partir duquel les données importées vont être inscrites puis éditées dans le fichier Excel : il faut choisir la case A1 de la première feuille de calcul du nouveau fichier Excel.

L'édition des données importées fait apparaître :

- Colonne 1 **row ID** : il s'agit de l'identification des molécules via MZmine2 (non effectué ici) ou à défaut un numéro pour chaque molécule concernée,
- Colonne 2 **row m/z** : fait apparaître, pour chacune des molécules identifiées, la valeur de m/z calculée par le modèle centroïde,
- Colonne 3 **row retention time** : fait apparaître, pour chacune des molécules identifiées, la valeur du temps de rétention correspondant,
- Colonne 4 **row comment** : correspond, pour chacune des molécules identifiées au commentaire qui lui a éventuellement été associé dans MZmine2 par l'opérateur,
- Colonne 5 **row number of detected peaks** : indique, pour chacune des molécules identifiées, leur dénombrement sur l'ensemble des échantillons analysés (huiles essentielles).

Dans les colonnes suivantes et pour chaque huile essentielle cinq colonnes décrivent dans l'ordre :

- **peak status** : la détection de la molécule ou bien N/A,

- **peak m/z** : la valeur du centre de gravité des m/z pour chaque molécule, qui doit correspondre à **row m/z**,
- **peak retention time** : le temps de rétention correspondant à chaque molécule, qui doit correspondre à **row retention time**,
- **peak height** : la hauteur du pic pour chacune des molécules,
- **peak area** : l'aire du pic pour chacune des molécules.

Avant de procéder à l'analyse en composantes principales, il convient de sélectionner dans une nouvelle feuille de calcul les molécules identifiées ainsi que l'aire du pic correspondant pour chacune des 23 huiles essentielles, de renommer les huiles essentielles en donnant le nom de l'espèce dont elles sont issues et en faisant apparaître le score d'activité antifongique calculé comme suit (*Tableau 20*) et enfin de transformer les données numériques des aires des pics pour chaque molécule en pourcentage relatif de la composition de chacune des 23 huiles essentielles (une même valeur fixe d'aire est attribuée au pic majoritaire de chaque huile et les proportions relatives de chaque constituant recalculées en fonction de façon à normaliser tous les chromatogrammes pré-traités par MZmine).

Tableau 20 : Valeurs des scores d'activité antifongique attribués en fonction de la CIM mesurée en µg/ml

MIC	>500	500	250	125	62	31	16	8
Score	0	1	2	3	4	5	6	7

Traitement des données sous XLstat version 3.02

L'analyse en composantes principales est réalisée avec n = 23 échantillons d'huiles essentielles. L'ACP est associée à une matrice diagonale de corrélation de Pearson entre les 23 huiles essentielles et à une seconde matrice de corrélation entre les 23 huiles essentielles et les 23 facteurs des composantes principales de l'ACP.

Bibliographie

- Abaul, J., Bourgeois, P. and Bessiere, J.-M., 1995. Chemical composition of the essential oils of chemotypes of *Pimenta racemosa* var. *racemosa* (P. Miller) J.W. Moore (Bois d'Inde) of Guadeloupe (F.W.I.). *Flavour Fragr. J.* 10, 319-321.
- Abdel-Malek, S., Bastien, J.W., Mahler, W.F., Jia, Q., Reinecke, M.G., Robinson, W.E., Shu, Y.H. and Zalles-Asin, J., 1996. Drug leads from the Kallaway herbalists of Bolivia. 1. Background, rationale, protocol and anti-HIV activity. *J. Ethnopharmacol.* 50, 157-166.
- Adams, R.P., 1995. Identification of essential oil components by gas chromatography/mass spectrometry. Allured Publishing Corporation, Carol Stream, IL.
- Adams, R.P., 2000. The serrate leaf margined *Juniperus* (Section Sabina) of the western hemisphere: systematics and evolution based on leaf essential oils and Random Amplified Polymorphic DNAs (RAPDs). *Biochem. Syst. Ecol.* 28, 975-989.
- Adams, R.P., Morris, J.A., Pandey, R.N. and Schwarzbach, A.E., 2005. Cryptic speciation between *Juniperus deltoides* and *Juniperus oxycedrus* (Cupressaceae) in the Mediterranean. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 771-787.
- Afssaps, 2008. Commission Nationale de Pharmacopée - Assemblée Plénière.
- Ajaiyeoba, E.O., Abalogu, U.I., Krebs, H.C. and Oduola, A.M.J., 1999. *In vivo* antimalarial activities of *Quassia amara* and *Quassia undulata* plant extracts in mice. *J. Ethnopharmacol.* 67, 321-325.
- Ajaiyeoba, E.O. and Krebs, H.C., 2003. Antibacterial and antifungal activities of *Quassia undulata* and *Quassia amara* extracts *in vitro*. *Afr. J. Med. Med. Sci.* 32, 353-356.
- Ajaiyeoba, E.O., Oladepo, O., Fawole, O.I., Bolaji, O.M., Akinboye, D.O., Ogundahunsi, O.A.T., Falade, C.O., Gbotosho, G.O., Itiola, O.A., Hapipi, T.C., Ebong, O.O., Ononiwu, I.M., Osowole, O.S., Oduola, O.O., Ashidi, J.S. and Oduola, A.M.J., 2003. Cultural categorization of febrile illnesses in correlation with herbal remedies used for treatment in Southwestern Nigeria. *J. Ethnopharmacol.* 85, 179-185.
- Albach, D.C., Meudt, H.M. and Oxelman, B., 2005. Piecing together the "new" Plantaginaceae. *Am. J. Bot.* 92, 297-315.
- Aligiannis, N., Kalpoutzakis, E., Mitaku, S. and Chinou, I.B., 2001. Composition and antimicrobial activity of the essential oils of two *Origanum* species. *J. Agric. Food Chem.* 49, 4168-4170.
- Almeida, M.M.B., Arriaga, A.M.C., A.K.L., d.S., Lemos, T.L.G., Braz-Filho, R. and Vieira, I.J.C., 2007. Ocorência et atividade biológica de quassinóides da última década. *Quim. Nova* 30, 935-951.
- Amparo Blasquez, M., Pérez, I. and Boira, H., 2003. Essential oil analysis of *Teucrium libanitis* and *T. turredanum* by GC and GC-MS. *Flavour Fragr. J.* 18, 497-501.
- An, R.-B., Kim, H.-C., Tian, Y.-H. and Koim, Y.-C., 2005. Free radical scavenging and hepatoprotective constituents from the leaves of *Juglans sinensis*. *Arch. Pharm. Res.* 28, 529-533.

- Anderson, R.G., 2004. Brazilian Snapdragon (*Otacanthus azureus*) for the Cut Flower Market. Floriculture Research Report 15-04, <http://www.uky.edu/Ag/Horticulture/anderson/otacanthus.pdf>.
- Andrade, E.H.A., Carreira, L.M.M. and Zoghbi, M.G.B., 2006. Volatile of the leaves, stems and flowers of *Otacanthus azureus* (Linden) Ronse. J. Essent. Oil Res. 18, 481-482.
- Angell, M., 2004. Excess in the pharmaceutical industry. CMAJ 171, 1451-1453.
- Apers, S., Cimanga, K., Vanden Berghe, D., Van Meenen, D., Otshudi Longanga, A., Foriers, A., Vlietinck, A. and Pieters, L., 2002. Antiviral activity of Simalikalactone D, a quassinoid from *Quassia africana*. Planta Med. 68, 20-24.
- Arnot, D.E. and Gull, K., 1998. The *Plasmodium* cell-cycle: facts and questions. Ann. Trop. Med. Parasitol. 92, 361-365.
- Assad, Y.O.H., Torto, B., Hassanali, A., Njagi, P.N.G., Bashir, N.H.H. and Mahmat, H., 1997. Seasonal variation in the essential oil composition of *Commiphora quadricincta* and its effect on the maturation of immature adults of the desert locust, *Schistocerca gregaria*. Phytochemistry 44, 833-841.
- Asuming, W.A., Beauchamp, P.S., Descalzo, J.T., Dev, B.C., Dev, V., Frost, S. and Ma, C.W., 2005. Essential oil composition of four *Lomatium* Raf. species and their chemotaxonomy. Biochem. Syst. Ecol. 33, 17-26.
- Atchinson, E., 1947. Chromosome numbers in the Myrtaceae. Am. J. Bot. 34, 159-164.
- Aurore, G.S., Abaul, J. and Bourgeois, P., 1998. Antibacterial and antifungal activities of the essential oils of *Pimenta racemosa* var. *racemosa* P.Miller (J.W. Moore) (Myrtaceae). J. Essent. Oil Res. 10, 161-164.
- Badilla, B., Miranda, T., Mora, G. and Vargas, K., 1998. Actividad gastrointestinal del extracto acuoso bruto de *Quassia amara* (Simarubaceae). Rev. Biol. Trop. 46, 203-210.
- Baird, J.K., 2005. Effectiveness of antimalarial drugs. N. Engl. J. Med. 352, 65-77.
- Baixench, M.-T., Aoun, N., Desnos-Ollivier, M., Garcia-Hermoso, D., Bretagne, S., Ramires, S., Piketty, C. and Dannaoui, E., 2007. Acquired resistance to echinocandins in *Candida albicans*: case report and review. J. Antimicrob. Chemoth. 59, 1076-1083.
- Bakkali, F., Averbeck, S., Averbeck, D. and Idaomar, M., 2008. Biological effects of essential oils – A review. Food Chem. Tox. 46, 446-475.
- Balayssac, S., Trefi, S., Gilard, V., Malet-Martino, M., Martino, R. and Delsuc, M.-A., 2009. 2D and 3D DOSY ¹H NMR, a useful tool for analysis of complex mixtures: Application to herbal drugs or dietary supplements for erectile dysfunction. J. Pharm. Biomed. Anal. 50, 602-612.
- Baltz, R.H., 2008. Renaissance in antibacterial discovery from actinomycetes. Curr. Opin. Pharmacol. 8, 557-563.
- Balunas, M.J. and Kinghorn, A.D., 2005. Drug discovery from medicinal plants. Life Sci. 78, 431-441.

- Barbetti, P., Grandolini, G., Fardella, G. and Chiappini, I., 1993. Quassinoids from *Quassia amara*. *Phytochemistry* 32, 1007-1013.
- Beck-Sagué, C., Jarvis, W.R. and NNIS, 1993. Secular trends in the epidemiology of nosocomial fungal infections in the United-States, 1980-1990. *J. Infect. Dis.* 167, 1247-1251.
- Bedikian, A.Y., Valdivieso, M., Bodey, G.P., Murphy, W.K. and Freireich, E.J., 1979. Initial clinical studies with bruceantin. *Cancer Treat. Rep.* 63, 1843-1847.
- Bednarek, P. and Osbourn, A., 2009. Plant-microbe interactions: chemical diversity in plant defense. *Science* 324, 746-747.
- Beghyn, T., Desprez-Poulain, R., Willand, N., Folleas, B. and Desprez, B., 2008. Natural compounds: leads or ideas ? Bioinspired molecules for drug discovery. *Chem. Biol. Drug Des.* 72, 3-15.
- Bero, J., Frédérick, M. and Quetin-Leclerc, J., 2009. Antimalarial compounds isolated from plants used in traditional medicine. *J. Pharm. Pharmacol.* 61, 1401-1433.
- Bertani, S., 2006. Simalikalactone D, molécule issue de la pharmacopée traditionnelle amazonienne : activité antipaludique et mécanisme d'action. Thèse de doctorat, Université Pierre et Marie Curie, Paris 6.
- Bertani, S., Bourdy, G., Landau, I., Robinson, J.C., Esterre, P. and Deharo, E., 2005. Evaluation of French Guiana traditional antimalarial remedies. *J. Ethnopharmacol.* 98, 45-54.
- Bertani, S., Houël, E., Bourdy, G., Stien, D., Jullian, V., Landau, I. and Deharo, E., 2007. *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) leaf tea: Effect of the growing stage and desiccation status on the antimalarial activity of a traditional preparation. *J. Ethnopharmacol.* 111, 40-42.
- Bertani, S., Houël, E., Stien, D., Chevolot, L., Jullian, V., Garavito, G., Bourdy, G. and Deharo, E., 2006. Simalikalactone D is responsible for the antimalarial properties of an amazonian traditional remedy made with *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). *J. Ethnopharmacol.* 108, 155-157.
- Bilia, A.R., Melillo de Malghaes, P., Bergonzi, M.C. and Vincieri, F.F., 2006. Simultaneous analysis of artemisinin and flavonoids of several extracts of *Artemisia annua* L. obtained from a commercial sample and a selected cultivar. *Phytomedicine* 13, 487-493.
- Boccard, J., Veuthey, J.L. and Rudaz, S., 2010. Knowledge discovery in metabolomics: an overview of MS data handling. *J. Sep. Sci.* 33, 290-304.
- Bombarda, I., Raharivelomanana, P., Ramanoelina, P.A.R., Faure, R., Bianchini, J.-P. and Gaydou, E.M., 2001. Spectrometric identifications of sesquiterpene alcohols from niaouli (*Melaleuca quinquenervia*) essential oil. *Anal. Chim. Acta* 447, 113-123.
- Boti, J.B., Muselli, A., Tomi, F., Koukoua, G., N'Guessan, T.Y., Costa, J. and Casanova, J., 2006. Combined analysis of *Cymbopogon giganteus* Chiov. leaf oil from Ivory Coast by GC/RI, GC/MS and ¹³C-NMR. *C.R. Chimie* 9, 164-168.

- Bourdy, G., Willcox, M.L., Ginsburg, H., Rasoanaivo, P., Graz, B. and Deharo, E., 2008. Ethnopharmacology and malaria: new hypothetical leads or old efficient antimalarials ? Int. J. Parasitol. 38, 33-41.
- Bourgeois, P., 1995. Une plante aromatique de la Caraïbe: le bois d'Inde. Journ. d'Agric. Trad. et de Bota. Appl. 37, 139-149.
- Bradley, S.A., Krishnamurthy, K. and Hu, H., 2005. Simplifying DOSY spectra with selective TOCSY edited preparation. J. Magn. Res. 172, 110-117.
- Brady, S.F., Bondi, S.M. and Clardy, J., 2001. The guanacastepenes: a highly diverse family of secondary metabolites produced by an endophytic fungus. J. Am. Chem. Soc. 123, 9900-9901.
- Bray, D.H., Boardman, P., O'Neill, M.J., Chan, K.L., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C. and Suffness, M., 1987. Plant as sources of antimalarial drugs. 5. Activities of *Ailanthus altissima* stem constituents and of some related quassinoids. Phytother. Res. 1, 22-24.
- Brower, V., 2008. Back to nature: extinction of medicinal plants threatens drug discovery. JNCI 100, 838-839.
- Bruleaux, A.M., 1990. Deux productions passées de la forêt guyanaise : l'essence de bois de rose et la gomme de balata. Bois et Forêts des Tropiques 219, 99-113.
- Brunaux, O., Demenois, J., 2004. Aménagement forestier et exploitation en forêt tropicale humide guyanaise. In : Rev. For. Fr. LV - numéro spécial 2003 - Connaissance et gestion de la forêt guyanaise, Nancy, France, 360 p. (pp.260-272).
- Buchbauer, G., 2000. The detailed analysis of essential oils leads to the understanding of their properties. Perfum. Flavor. 25, 64-67.
- Butler, A.R., Khan, S. and Ferguson, E., 2010. A brief history of malaria chemotherapy. J. R. Coll. Physicians Edinb. 40, 172-177.
- Cabral, J.A., McChesney, J.D. and Milhous, W.K., 1993. A new antimalarial quassinoid from *Simaba guianensis*. J. Nat. Prod. 56, 1954-1961.
- Cachet, N., Hoakwie, F., Bertani, S., Bourdy, G., Deharo, E., Stien, D., Houël, E., Gornitzka, H., Fillaux, J., Chevalley, S., Valentin, A. and Jullian, V., 2009. Antimalarial activity of Simalikalactone E, a new quassinoid from *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). AAC 53, 4393-4398.
- Calderon, L.A., Silva-Jardim, I., Zuliani, J.P., De Almeida e Silva, A., Ciancaglini, P., da Silva, L.H.P. and Stabeli, R.G., 2009. Amazonian biodiversity: a view of drug development for leishmaniasis and malaria J. Braz. Chem. Soc. 20, 1011-1023.
- Capasso, L., 1998. 5300 years ago, the Ice Man used natural laxatives and antibiotics. Lancet 352, 1864.
- Carme, B., 2005. Substantial increase of malaria in inland areas of Eastern French Guiana. Trop. Med. Int. Health 10, 154-159.

- Carme, B., Ardillon, V., Girod, R., Grenier, C., Joubert, M., Djossou, F. and Ravachol, F., 2009. Situation épidémiologique du paludisme en Guyane. *Med. Trop.* 69, 19-25.
- Carson, C.F., Mee, B.J. and Riley, T.V., 2002. Mechanism of action of *Melaleuca alternifolia* (Tea Tree) oil on *Staphylococcus aureus* determined by time-kill, lysis, leakage, and salt tolerance assays and electron microscopy. *AAC* 46, 1914-1920.
- Carson, C.F. and Riley, T.V., 2003. Non-antibiotic therapies for infectious diseases. *Commun. Dis. Intell.* 27, S144-S147.
- Cavalli, J.F., 2002. Caractérisation par CPG/IK, CPG/SM et RMN du carbone-13 d'huiles essentielles de Madagascar. Thèse de doctorat, Université de Corse Pascal Paoli.
- Cavalli, J.F., Tomi, F., Bernardini, A.F. and Casanova, J., 2003. Composition and chemical variability of the bark oil of *Cedrelopsis grevei* H. Baillon from Madagascar. *Flavour Fragr. J.* 18, 532-538.
- Chantraine, J.-M., Dhénin, J.-M. and Moretti, C., 2009. Chemical variability of rosewood (*Aniba rosaeodora* Ducke) essential oil in French Guiana. *JEOR* 21, 486-495.
- Chen, Y.-J., Cheng, S.-S. and Chang, S.-T., 2010. Monitoring the emission of volatile organic compounds from the leaves of *Calocedrus macrolepis* var. *formosana* using solid-phase micro-extraction. *J. Wood. Sci.* 56, 140-147.
- Cheng, S.-S., Liu, J.-Y., Chang, E.-H. and Chang, S.-T., 2008. Antifungal activity of cinnamaldehyde and eugenol congeners against wood-rot fungi. *Biores. Tech.* 99, 5145-5149.
- Clardy, J. and Walsh, C., 2004. Lessons from natural molecules. *Nature* 432, 829-837.
- Clark, E.P., 1937. Quassin. II. Neoquassin. *J. Am. Chem. Soc.* 59, 2511.
- Corcoran, O. and Spraul, M., 2003. LC–NMR–MS in drug discovery. *Drug Discovery Today* 8, 624-631.
- Cordell, G.A., 1995. Changing strategies in natural products chemistry. *Phytochemistry* 40, 1585-1612.
- Correa-Royero, J., Tangarife, V., Duran, C., Stashenko, E. and Mesa-Arango, A., 2010. *In vitro* antifungal activity and cytotoxic effect of essential oils and extracts of medicinal and aromatic plants against *Candida krusei* and *Aspergillus fumigatus*. *Braz. J. Pharmacogn.* 20, 734-741.
- Correia, S.J., David, J.M., da Silva, E., David, J.P., Lopes, L.M.X. and Guedes, M.L., 2008. Flavonoids, norisoprenoids and other terpenes from leaves of *Tapirira guianensis*. *Quim. Nova* 31, 2056-2059.
- Cos, P., Vlietinck, A., Vanden Berghe, D. and Maes, L., 2006. Anti-infective potential of natural products: How to develop a stronger in vitro "proof-of-concept". *J. Ethnopharmacol.* 106, 290-302.
- Courtois, E.A., Paine, T., Blandinieres, P.-A., Stien, D., Bessiere, J.-M., Houël, E., Baraloto, C. and Chave, J., 2009. Diversity of the volatile organic compounds emitted by 55 species of tropical trees: a survey in French Guiana. 35, 1949-1962.
- Cox, F.E., 2010. History of the discovery of the malaria parasites and their vectors. *Parasite Vector* 3, 5-13.

- Cronin, G., Lindquist, N., Hay, M.E. and Fenical, W., 1995. Effects of storage and extraction procedures on yields of lipophilic metabolites from the brown seaweeds *Dictyota ciliolata* and *D. menstrualis*. Mar. Ecol. Prog. Ser. 119, 265-273.
- Croteau, R., Kutchan, T.M. and Lewis, N.G., 2000. Natural products (secondary metabolites). In : Biochemistry and Molecular Biology of Plants, Jones, R.L., Buchanan, B.B., Guissem, W. (Eds). American Society of Plant Physiologists, 1408 p. (pp.1250-1318).
- Cuendet, M. and Pezzuto, J.M., 2004. Antitumor activity of bruceantin: an old drug with new promise. J. Nat. Prod. 67, 269-272.
- Da Silva, C.B., Guterres, S.S., Weisheimer, V. and Schapoval, E.E.S., 2008. Antifungal activity of the Lemongrass oil and citral against *Candida* spp. Braz. J. Infect. Dis. 12, 63-66.
- Da Silva, J.D., Luz, A.I.R., Da Silva, M.H.L., Andrade, E.H.A., Zoghbi, M.G.B. and Maia, J.G.S., 2003. Essential oils of the leaves and stems of four *Psidium* spp. Flavour Fragr. J. 18, 240-243.
- Damjanovic, B., Lepojevic, Z., Zivkovic, V. and Tolic, A., 2005. Extraction of fennel (*Foeniculum vulgare* Mill.) seeds with supercritical CO₂: Comparison with hydrodistillation. Food Chem. 92, 143-149.
- Davis, A.L., Cai, Y., Davies, A.P. and Lewis, J.R., 1996. ¹H and ¹³C NMR assignments of some green tea polyphenols. Magn. Reson. Chem. 34, 887-890.
- De Buyck, L.F., De Pooter, H.L., Schamp, N.M., de Bruyn, A., Zhang, W., Budesinsky, M. and Moti, O., 1989. Terpenes from *Otacanthus coeruleus* Lindl. Identification of β -copaen-4 α -ol and a new criterion for discriminating between isomeric copaene and ylangene structures. Flavour Fragr. J. 4, 53-57.
- De Granville, J.-J., 2008. Végétation. In : Atlas illustré de la Guyane 2008, Barret, J. (Ed). Aruag (Agence Régionale d'Urbanisme et d'Aménagement de la Guyane), Feytiat, France, 219 p. (pp.52-57).
- De Pooter, H.L., De Buyck, L.F., Schamp, N.M., Billiet, F. and De Bruyn, A., 1989. The volatile fraction of *Otacanthus coeruleus* Lindl. containing the new copaene derivative β -copaen-4 α -ol. Flavour Fragr. J. 4, 47-51.
- Deharo, E. and Ginsburg, H., 2011. Analysis of additivity and synergism in the anti-plasmodial effect of purified compounds from plant extracts. Malar. J. 10, 55-59.
- Desjardins, R.E., Canfield, C.J., Haynes, J.D. and Chulay, J.D., 1979. Quantitative assessment of antimalarial activity *in vitro* by a semiautomated microdilution technique. AAC 16, 710-718.
- Dettmer, K., Aronov, P.A. and Hammock, B.D., 2007. Mass spectrometry-based metabolomics. Mass. Spectrom. Rev. 26, 51-78.
- Dewick, P.M., 2009. Medicinal natural products - a biosynthetic approach. 3rd edition., Wiley (Ed). Chippenham, Great Britain, 539 p.
- Dondorp, A.M., Yeung, S., White, L., Nguon, C., Day, N.P.J., Socheat, D. and Von Seidlein, L., 2010. Artemisinin resistance: current status and scenarios for containment. Nature 8, 272-280.

- Dorman, H.D.J. and Deans, S.G., 2000. Antimicrobial agents from plants: antibacterial activity of plant volatile oils. *J. Appl. Microbiol.* 88, 308-316.
- Dorvault, F., 1880. Quassia de la Jamaïque / Quassine. In : *L'officine ou répertoire général de pharmacie pratique*, Paris.
- Dou, J., McChesney, J.D., Sindelar, R.D., Goins, D.K., Khan, I.A. and Walker, L.A., 1996. A new quassinoid from crude quassin extract of *Quassia amara*. *Int. J. Pharm.* 34, 349-354.
- Drieu, K., 1986. Préparation et définition de l'extrait de *Ginkgo biloba*. *La presse médicale* 15, 1455-1457.
- Dubey, N.K., Kumar, R. and Tripathi, P., 2004. Global promotion of herbal medicine: India's opportunity. *Curr. Sci.* 86, 37-41.
- Dujardin, E. and Mann, S., 2002. Bio-inspired materials chemistry. *Adv. Mater.* 14, 775-788.
- Dusfour, I., Carinci, R., Gaborit, P., Issaly, J. and Girod, R., 2010. Evaluation of four methods for collecting malaria vectors in French Guiana. *J. Econ. Entomol.* 103, 973-976.
- Elewski, B.E., 1998. Onychomycosis: pathogenesis, diagnosis, and management. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 415-429.
- Ene, A.C., Atawodi, S.E., Ameh, D.A., Kwanashie, H.O. and Agomo, P.U., 2010. Locally used plants for malaria therapy amongst the Hausa, Yoruba and Ibo communities in Maiduguri, Northeastern Nigeria. *IJKT* 9, 486-490.
- Eparvier, V., Thoison, O., Bousserouel, H., Guéritte, F., Sévenet, T. and Litaudon, M., 2007. Cytotoxic farnesyl glycosides from *Pittosporum pancheri*. *Phytochemistry* 68, 604-608.
- Erman, A. and Ranke, H., 1994. *La civilisation égyptienne.*, Grande bibliothèque Payot, Paris, France, 749 p.
- Esterre, P., Volney, B., Meynard, J.-B. and Legrand, E., 2009. Intérêt d'un observatoire régional de la chimiorésistance du paludisme, problème émergent de santé publique dans la région des Guyanes. *Bull. Soc. Path. Exo.* 102, 179-184.
- Evans, B.E., Rittle, K.E., Bock, M.G., DiPardo, R.M., Freidinger, R.M., Whitter, W.L., Lundell, G.F., Veber, D.F., Anderson, P.S., Chang, R.S.L., Lotti, V.J., Cerino, D.J., Chen, T.B., Kling, P.J., Kunkel, K.A., Springer, J.P. and Hirshfield, J., 1988. Methods for drug discovery: development of potent, selective, orally effective cholecystokinin antagonists. *J. Med. Chem.* 31, 2235-2246.
- Fabricant, D.S. and Farnsworth, N.R., 2001. The value of plants used in traditional medicine for drug discovery. *Environ. Health Perspect.* 109, 69-75.
- Fiaschetti, G., Grotzer, M.A., Shalaby, T., Castelletti, D. and Arcaro, A., 2011. Quassinoids: from traditional drugs to new cancer therapeutics. *Curr. Med. Chem.* 18, 316-328.
- Figueiredo, A.C., Barroso, J.G., Pedro, L.G. and Scheffer, J.C., 2008. Factors affecting secondary metabolites production in plants: volatile components and essential oils. *Flavour Fragr. J.* 23, 213-226.

- Filipowicz, N., Kaminski, M., Kurlenda, J., Asztemborska, M. and Ochocka, J.R., 2003. Antibacterial and antifungal activity of Juniper berry oil and its selected components. *Phytother. Res.* 17, 227-231.
- Fleury, M., 2007. Remèdes wayana - Wajana epit. GADEPAM - CRDP (Ed). Cayenne, France, 111 p., Cayenne.
- Fleury, M., Moretti, C., Bereau, D., 2004. Usage des ressources forestières en Guyane : de la tradition à la valorisation. In : *Rev. For. Fr. LV - numéro spécial 2003 - Connaissance et gestion de la forêt guyanaise*, Nancy, France, 360 p. (p.291-305).
- Fontenelle, R.O.S., Morais, S.M., Brito, E.H.S., Brilhante, R.S.N., Cordeiro, R.A., Nascimento, N.R.F., Kerntopf, M.R., Sidrim, J.J.C. and Rocha, M.F.G., 2008. Antifungal activity of essential oils of *Croton* species from the Brazilian Caatinga biome. *J. Appl. Microbiol.* 104, 1383-1390.
- Fouque, F., Gaborit, P., Carinci, R., Issaly, J. and Girod, R., 2010. Annual variations in the number of malaria cases related to two different patterns of *Anopheles darlingi* transmission potential in the Maroni area of French Guiana. *Malar. J.* 9, 80-94.
- Fraisse, D., Heitz, A., Carnat, A., Carnat, A.-P. and Lamaison, J.-L., 2000. Quercetin 3-arabinopyranoside, a major flavonoid compound from *Alchemilla xanthochlora*. *Fitoterapia* 71, 463-464.
- Franzios, G., Mirotsou, M., Hatzia Apostolou, E., Kral, J., Scouras, Z.G. and Mavragani-Tsipidou, P., 1997. Insecticidal and genotoxic activities of mint essential oils. *J. Agric. Food Chem.* 45, 2690-2694.
- Frisvold, G. and Day-Rubenstein, K., 2008. Bioprospecting and biodiversity conservation : what happens when discoveries are made ? *Arizona Law Rev.* 50, 545-576.
- Gallo, M.B.C., Da Silva, F.C., Vieira, P.C., Fernandes, J.B. and Da Silva, M.F.D.G.F., 2006. New natural products from *Siphoneugena densiflora* Berg (Myrtaceae) and their chemotaxonomic significance. *J. Braz. Chem. Soc.* 17, 279-288.
- Gallori, S., Flamini, G., Bilia, A.R., Morelli, I., Landini, A. and Vincieri, F.F., 2001. Chemical composition of some traditional herbal drug preparations: essential oil and aromatic water of Costmary (*Balsamita suaveolens* Pers.). *J. Agric. Food Chem.* 49, 5907-5910.
- Galvan, B. and Mariscal, F., 2006. Epidemiología de la candidemia en UCI. *Rev. Iberoam. Micol.* 23, 12-15.
- Garcia-Barrantes, P.M. and Badilla, B., 2011. Anti-ulcerogenic properties of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae) standardized extracts in rodent models *J. Ethnopharmacol.* In press.
- Garcia Gonzalez, M., Gonzalez Camach, S.M. and Pazos Sanou, L., 1997. Pharmacologic activity of the aqueous wood extract from *Quassia amara* (Simaroubaceae) on albino rats and mice. *Rev. Biol. Trop.* 44-45, 47-50.
- Garcia, L.S., 2010. Malaria. *Clin. Lab. Med.* 30, 93-129.
- Garcia, Y.D., Valles, B.S. and Lobo, A.P., 2009. Phenolic and antioxidant composition of by-products from the cider industry: apple pomace. *Food Chem.* 117, 731-738.

- Garneau, S., Martin, N.I. and Vederas, J.C., 2002. Two-peptide bacteriocins produced by lactic acid bacteria. *Biochimie* 84, 577-592.
- Gaucherel, C., 2002. Use of wavelet transform for temporal characterisation of remote watersheds. *J. Hydrol.* 269, 101-121.
- Gauvin, A. and Smadja, J., 2005. Essential oil composition of four *Psiadia* species from Reunion Island: a chemotaxonomic study. *Biochem. Syst. Ecol.* 33, 705-714.
- Geidam, Y.A., Usman, H., Abubakar, M.B. and Ibrahim, B., 2007. Effects of aqueous leaf extracts of *Psidium guajava* on bacteria isolated from the navel of day-old chicks. *Res. J. Microbiol.* 2, 960-965.
- Georgopapadakou, N.H. and Walsh, T.J., 1996. Antifungal agents: chemotherapeutic targets and immunologic strategies. *AAC* 40, 279-291.
- Gershenzon, J. and Dudareva, N., 2007. The function of terpene natural products in the natural world. *Nat. Chem. Biol.* 3, 408-414.
- Gertsch, J., 2009. How scientific is the science in ethnopharmacology ? Historical perspectives and epistemological problems. *J. Ethnopharmacol.* 122, 177-183.
- Gilani, A.H. and Atta-ur-Rhaman, 2005. Trends in ethnopharmacology. *J. Ethnopharmacol.* 100, 43-49.
- Gilly, G., 1997. Les plantes à parfum et huiles essentielles à Grasse - Botanique, culture, chimie, production et marché. L'Harmattan (Ed), Paris, France, 428 p.
- Ginsburg, H. and Deharo, E., 2011. A call for using natural compounds in the development of new antimalarial treatments – an introduction. *Malar. J.* 10, 51-57.
- Goldman, P., 2001. Herbal medicines today and the roots of modern pharmacology. *Ann. Intern. Med.* 135, 594-600.
- Gomes, S.M., Somavilla, N.S.D.N., Gomes-Bezerra, M., de Miranda, S.C., De-Carvalho, P.S. and Graciano-Ribeiro, D., 2009. Anatomia foliar de espécies de Myrtaceae: contribuições à taxonomia e filogenia. *Acta Bot. Bras.* 23, 223-238.
- Gostan, T., Tramesel, D., Brun, E., Prigent, Y. and Delsuc, M.-A., 2004. L'expérience DOSY, une puissante méthode RMN pour l'analyse de mélanges complexes et la détection de traces. *Spectra analyse* 240, 25-32.
- Govinden-Soulange, J., Magan, N., Gurib-Fakim, A., Gauvin, A., Smadja, J. and Kodja, H., 2004. Chemical composition and *in vitro* antimicrobial activities of the essential oils from endemic *Psiadia* species growing in Mauritius. *Biol. Pharm. Bull.* 27, 1814-1818.
- Grandolini, G., Casinovi, C.G., Barbetti, P. and Fardella, G., 1987. A new neoquassin derivative from *Quassia amara*. *Phytochemistry* 26, 3085-3087.

- Grenand, P. and Grenand, F., 2008. Les groupes humains. In : Atlas illustré de la Guyane 2008, Barret, J. (Ed), Aruag (Agence Régionale d'Urbanisme et d'Aménagement de la Guyane), Feytiat, France, 219 p. (pp.30-33).
- Grenand, P., Moretti, C., Jacquemin, H. and Prévost, M.-F., 2004. Pharmacopées traditionnelles en Guyane. IRD Editions, Paris, France, 816 p.
- Grieco, P.A., Ferrino, S. and Vidari, G., 1980. Total synthesis of dl-quassin. J. Am. Chem. Soc. 102, 7586-7587.
- Groussin, J., 2001. Le climat guyanais. In : Atlas illustré de la Guyane 2001, Barret, J. (Ed). 215 p. (pp.46-49).
- Guo, Z., Vangapandu, S., Sindelar, R.W., Walker, L.A. and Sindelar, R.D., 2005. Biologically active quassinoids and their chemistry: potential leads for drug design. Curr. Med. Chem. 12, 173-190.
- Gupta, A.K., Saxena, S. and Saxena, M., 2010. Integrated ligand and structure based studies of flavonoids as fatty acid biosynthesis inhibitors of *Plasmodium falciparum*. Bioorg. Med. Chem. Lett. 20, 4779-4781.
- Gurib-Fakim, A., 2006. Medicinal plants: traditions of yesterday and drugs of tomorrow. Mol. Asp. Med. 27, 1-93.
- Hadacek, F. and Greger, H., 2000. Testing of antifungal natural products : methodologies, comparability of results and assay choice. Phytochem. Anal. 11, 137-147.
- Hall, R.D., 2005. Plant metabolomics: from holistic hope, to hype, to hot topic. New Phytol. 169, 453-468.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V., 1999. Antimicrobial activity of essential oils and other plant extracts. J. Appl. Microbiol. 86, 985-990.
- Hammer, K.A., Carson, C.F. and Riley, T.V., 2003. Antifungal activity of the components of *Melaleuca alternifolia* (tea tree) oil. J. Appl. Microbiol. 95, 853-860.
- Handelsman, J., Rondon, M.R., Brady, S.F., Clardy, J. and Goodman, R.M., 1998. Molecular biological access to the chemistry of unknown soil microbes: a new frontier for natural products. Chem. Biol. 5, 245-249.
- Hanf, M., Stephani, A., Basurko, C., Nacher, M. and Carne, B., 2009. Determination of the *Plasmodium vivax* relapse pattern in Camopi, French Guiana. Malar. J. 8, 278-282.
- Hanif, A., Hossan, S., Mia, M.M.K., Islam, M.J., Jahan, R. and Rahmatullah, M., 2009. Ethnobotanical survey of the Rakhain tribe inhabiting the Chittagong hill tracts region of Bangladesh. AENSI 3, 172-180.
- Hanson, K.R., Jaquiss, D.B., Lamberton, J.A., Robertson, A. and Savige, W.E., 1954. Quassin and neoQuassin. Part III. J. Chem. Soc., 4238-4250.
- Hartmann, T., 2007. From waste products to ecochemicals: Fifty years research of plant secondary metabolism. Phytochemistry 68, 2831-2846.
- Hay, R.J., 2006. Fungal infections. Clin. Dermatol. 24, 201-212.
- Hazzit, M., Baaliouamer, A., Faleiro, L. and Miguel, M.G., 2006. Composition of the essential oils of *Thymus* and *Origanum* species from Algeria and their antioxidant and antimicrobial activities. J. Agric. Food Chem. 54, 6314-6321.

- Heinrich, M., 2008. Ethnopharmacy and natural product research—Multidisciplinary opportunities for research in the metabolomic age. *Phytochem. Lett.* 1, 1-5.
- Heinrich, M., Edwards, S., Moerman, D.E. and Leonti, M., 2009. Ethnopharmacological field studies: A critical assessment of their conceptual basis and methods. *J. Ethnopharmacol.* 124, 1-17.
- Heinrich, M. and Teoh, H.L., 2004. Galanthamine from snowdrop - the development of a modern drug against Alzheimer's disease from local Caucasian knowledge. *J. Ethnopharmacol.* 92, 147-162.
- Hippocrate, De la nature de la femme. In : Oeuvres complètes - volume 7, Baillière, J.-B. (Ed). Littré, Paris, France, 1851, 674 p., consulté sur <http://web2.bium.univ-paris5.fr/livanc/?p=370&cote=34859x07&do=page>
- Hitotsuyanagi, Y., Kim, I.H., Hasuda, T., Yamauchi, Y. and Takeya, K., 2006. A structure-activity relationship study of brusatol, an antitumor quassinoid. *Tetrahedron* 62, 4262-4271.
- Hood, J.R., Wilkinson, J.R. and Cavanagh, H.M.A., 2003. Evaluation of common antibacterial screening methods utilized in essential oil research. *JEOR* 15, 428-433.
- Houël, E., Bertani, S., Bourdy, G., Deharo, E., Jullian, V., Valentin, A., Chevalley, S. and Stien, D., 2009. Quassinoid constituents of *Quassia amara* L. leaf herbal tea. Impact on its antimalarial activity and cytotoxicity. *J. Ethnopharmacol.* 126, 114-118.
- Houghton, P.J., Howes, M.-J., Lee, C.C. and Steventon, G., 2007. Uses and abuses of *in vitro* tests in ethnopharmacology: visualizing an elephant. *J. Ethnopharmacol.* 110, 391-400.
- Hunt, N.H., Golenser, J., Chan-Ling, T., Parekh, S., Rae, C., Potter, S., Medana, I.M., Miu, J. and Ball, H.J., 2006. Immunopathogenesis of cerebral malaria. *Int. J. Parasitol.* 36, 569-582.
- IEDOM, 2010. Guyane - Rapport annuel 2009. IEDOM (Institut d'Emission des Départements d'Outre-Mer), Paris, France, 204 p.
- Irkin, R. and Korukluoglu, M., 2009. Effectiveness of *Cymbopogon citratus* L. essential oil to inhibit the growth of some filamentous fungi and yeasts. *J. Med. Food* 12, 193-197.
- Isbell, J., Xu, R., Cai, Z. and Kassel, D.B., 2002. Realities of high-throughput liquid chromatography/mass spectrometry purification of large combinatorial libraries: a report on overall sample throughput using parallel purification. *J. Comb. Chem.* 4, 600-611.
- Itokawa, H., Morris-Natschke, S., Akiyama, T. and Lee, K.-H., 2008. Plant-derived natural product research aimed at new drug discovery. *J. Nat. Med.* 62, 263-280.
- Jambou, R., Legrand, E., Niang, M., Khim, N., Lim, P., Volney, B., Ekala, M.T., Bouchier, C., Esterre, P., Fandeur, T. and Mercereau-Puijalon, O., 2005. Resistance of *Plasmodium falciparum* field isolates to *in vitro* artemether and point mutations of the SERCA-type PfATPase6. *Lancet* 366, 1960-1963.
- Jamieson, C., 2006. Fungal infections - pharmacological therapies. *Hospital Pharmacist* 13, 321-325.

- Jansen, G., Lee, A.Y., Epp, E., Fredette, A., Surprenant, J., Harcus, D., Scott, M., Tan, E., Nishimura, T., Whiteway, M., Hallett, M. and Thomas, D.Y., 2009. Chemogenomic profiling predicts antifungal synergies. *Mol. Syst. Biol.* 5, 338-351.
- Jimenez-Escrig, A., Rincon, M., Pulido, R. and Saura-Calixto, F., 2001. Guava fruit (*Psidium guajava* L.) as a new source of antioxidant dietary fiber. *J. Agric. Food Chem.* 49, 5489-5493.
- Jongwutiwes, S., Putaporntip, C., Iwasaki, T., Sata, T. and Kanbara, H., 2004. Naturally acquired *Plasmodium knowlesi* malaria in human, Thailand. *Emerg. Infect. Diseases* 10, 2211-2213.
- Jordan, M.J., Martinez, R.M., Cases, M.A. and Sotomayor, J.A., 2003. Watering level effect on *Thymus hyemalis* Lange essential oil yield and composition. *J. Agric. Food Chem.* 51, 5420-5427.
- Juliani, H.R., Zygadlo, J.A., Scrivanti, R., De la Sota, E. and Simon, J.E., 2004. The essential oil of *Anemia tomentosa* (Savigny) Sw. var. *anthriscifolia* (Schrader.) Mickel. 19, 541-543.
- Katajamaa, M., Miettinen, J. and Oresic, M., 2006. MZmine: toolbox for processing and visualization of mass spectrometry based molecular profile data. *Bioinformatics* 22, 634-636.
- Katajamaa, M. and Oresic, M., 2005. Processing methods for differential analysis of LC/MS profile data. *BCM Bioinformatics* 6, 179-190.
- Katajamaa, M. and Oresic, M., 2007. Data processing for mass spectrometry-based metabolomics. *J. Chromatogr.A* 115, 318-328.
- Kaur, K., Jain, M., Kaur, T. and Jain, R., 2009. Antimalarials from nature. *Bioorg. Med. Chem.* 17, 3229-3256.
- Keasling, J.D., 2008. Synthetic biology for synthetic chemistry. *ACS Chem. Biol.* 3, 64-76.
- Khan, A., Ahmad, A., Akhtar, F., Yousuf, S., Xess, I., Khan, L.A. and Manzoor, N., 2010. *Ocimum sanctum* essential oil and its active principles exert their antifungal activity by disrupting ergosterol biosynthesis and membrane integrity. *Res. Microbiol.* 161, 816-823.
- Khaomek, P., Ichino, C., Ishiyama, A., Sekiguchi, H., Namatame, M., Ruangrungrasi, N., Saifa, E., Kiyohara, H., Otaguro, K., Omura, S. and Yamada, H., 2008. *In vitro* antimalarial activity of prenylated flavonoids from *Erythrina fusca*. *J. Nat. Med.* 62, 217-220.
- Kim, J., Lee, Y.S., Lee, S.G., Shin, S.C. and Park, I.K., 2008. Fumigant antifungal activity of plant essential oils and components from West Indian bay (*Pimenta racemosa*) and thyme (*Thymus vulgaris*) oils against two phytopathogenic fungi. *Flavour Fragr. J.* 23, 272-277.
- Kindermans, J.-M., Pilloy, J., Oliaro, P. and Gomes, M., 2007. Ensuring sustained ACT production and reliable artemisinin supply. *Malar. J.* 6, 125-130.
- Kingston, D.G.I., 2011. Modern natural products drug discovery and its relevance to biodiversity conservation. *J. Nat. Prod.* 74, 496-511.

- Kitagawa, I., Mahmud, T., Yokota, K., Nakagawa, S., Mayumi, T., Kobayashi, M. and Shibuya, H., 1996. Indonesian medicinal plantes. XVII. Characterization of quassinoids from the stem of *Quassia indica*. Chem. Pharm. Bull. 44, 2009-2014.
- Koch, M.A., Schuffenhauer, A., Scheck, M., Wetzel, S., Casaulta, M., Odermatt, A., Ertl, P. and Waldmann, P., 2005. Charting biologically relevant chemical space: a structural classification of natural products (SCONP). PNAS 102, 17272-17277.
- Koehn, F.E. and Carter, G.T., 2005. The evolving role of natural products in drug discovery. Nature 4, 206-220.
- Krettli, A.U., Andrade-Neto, V.F., Brandao, M.G.L. and Ferrari, W.M.S., 2001. The search for new antimalarial drugs from plants used to treat fever and malaria or plant randomly selected: a review. Mem. Inst. Oswaldo Cruz 96, 1033-1042.
- Ksouri, R., Megdiche, W., Falleh, H., Trabelsi, N., Boulaaba, M., Smaoui, A. and Abdelly, C., 2008. Influence of biological, environmental and technical factors on phenolic content and antioxidant activities of Tunisian halophytes. C.R. Biologies 331, 865-873.
- Kupchan, S.M., Britton, R.W., Ziegler, M.F. and Sigel, C.W., 1973. Bruceantin, a new potent antileukemic simaroubolide from *Brucea antidysenterica*. J. Org. Chem. 38, 178-179.
- Kupchan, S.M. and Streelman, D.R., 1976. Quassimarin, a new antileukemic quassinoid from *Quassia amara*. J. Org. Chem. 41, 3481-3482.
- Lago, J.H.G., De Oliveira, A., Guimaraes, E.F. and Kato, M.J., 2007. 3-Ishwarone and 3-Ishwarol, rare sesquiterpenes in essential oil from leaves of *Peperomia oreophila* Hensch. J. Braz. Chem. Soc. 18, 638-642.
- Lago, J.H.G., Favero, O.A. and Romoff, P., 2009. Chemical composition and seasonal variation of the volatile oils from leaves of *Michelia champaca* L., Magnoliaceae. Braz. J. Pharmacogn. 19, 880-882.
- Lang'at-Thoruwa, C., Kirby, G.C., Phillipson, J.D., Warhurst, D.C., Watt, R.A. and Wright, C.W., 2003. Enhancement of the antiplasmodial activity of quassin by transformation into a γ -lactone. J. Nat. Prod. 66, 1486-1489.
- Lang'at, C.C., Watt, R.A., Toth, I. and Phillipson, J.D., 1998. Semisynthetic derivatives of quassin. Tetrahedron 54, 6841-6856.
- Le Bras, J. and Deloron, P., 1983. *In vitro* study of drug sensitivity of *Plasmodium falciparum*: evaluation of a new semi-micro test. Am. J. Trop. Med. Hyg. 32, 447-451.
- Lee, S.-J., Han, J.-I., Lee, G.-S., Park, M.-J., Choi, I.-G., Na, K.-J. and Jeung, E.-B., 2007. Antifungal effect of eugenol and nerolidol against *Microsporum gypseum* in a Guinea pig model. Chem. Pharm. Bull. 30, 184-188.
- Leete, T.H. and Rubin, H., 1996. Malaria and the cell cycle. Parasitol. Today 12, 442-444.
- Lewis, W.H. and Elvin-Lewis, M.P., 1995. Medicinal plants as sources of new therapeutics. Ann. Missouri Bot. Gard. 82, 16-24.

- Li, J.W.H. and Vederas, J.C., 2009. Drug discovery and natural products: end of an era or an endless frontier ? Science 325, 161-165.
- Liu, Y., Murakami, N., Ji, H., Abreu, P. and Zhang, S., 2007. Antimalarial flavonol glycosides from *Euphorbia hirta*. Pharmaceut. Biol. 45, 278-281.
- Liu, Y. and Wang, M.-W., 2008. Botanical drugs: Challenges and opportunities - Contribution to Linnaeus memorial symposium 2007. Life Sci. 82, 445-449.
- Lochon, S. and Linarès, S., 2004. Conservation de la nature : les espaces protégés de la Guyane. In : Rev. For. Fr. LV - numéro spécial Connaissance et gestion de la forêt guyanaise, 360 p. (pp.323-339).
- Lopez Saez, J.A. and Perez Soto, J., 2008. Etnofarmacología y actividad biológica de *Quassia amara* (Simaroubaceae): Estado de la cuestión [Ethnopharmacology and biological activity of *Quassia amara* (Simaroubaceae): State of the art] Bol. Latinoam. Caribe Plant. Med. 7, 234-246.
- Lu, Y. and Yeap Foo, L., 1997. Identification and quantification of major polyphenols in apple pomace. Food Chem. 59, 187-197.
- Lu, Y. and Yeap Foo, L., 1999. The polyphenol constituents of grape pomace. Food Chem. 65, 1-8.
- Lughadha, E.N. and Proenca, C., 1996. A Survey of the reproductive biology of the Myrtoideae (Myrtaceae) Ann. Missouri Bot. Gard. 83, 480-503.
- Lupi, O., Tying, S.K. and McGinnis, M.R., 2005. Tropical dermatology: fungal tropical diseases. J. Am. Acad. Dermatol. 53, 931-951.
- Mabberley, D.J., 1997. The plant-book - a portable dictionary of the vascular plants. In: C. 2nd edition. Cambridge University Press (Ed.), UK, 858 p.
- Machado, L.B., Zoghbi, M.G.B. and Andrade, E.H.A., 2003. Seasonal variation in the composition of the essential oils from the leaves, thin branches and resin of *Protium spruceanum* (Benth.) Engl. Flavour Fragr. J. 18, 338-341.
- Maggi, P., Cecchini, C., Cresci, A., Coman, M.M., Tirillini, B., Sagratini, G. and Papa, F., 2009. Chemical composition and antimicrobial activity of the essential oil from *Ferula glauca* L. (F. communis L. subsp. glauca) growing in Marche (central Italy). Fitoterapia 80, 68-72.
- Mahanta, J.J., Chutia, M., Bordoloi, M., Pathak, M.G., Adhukary, R.K. and Sama, T.C., 2007. *Cymbopogon citratus* L. essential oil as a potential antifungal agent against key weed moulds of *Pleurotus* spp. Spawns. Flavour Fragr. J. 22, 525-530.
- Malcher, G.T., Santos, C.C., Lima, M.A.S. and Silveira, E.R., 2004. Unidimensional NMR, very simple but important tool for plant populational studies: *Croton sonderianus* Muell. Arg. Ann. Magn. Reson. 3, 99-101.
- Mancebo, F., Hilje, L., Mora, G.A. and Salazar, R., 2000. Antifeedant activity of *Quassia amara* (Simaroubaceae) extracts on *Hypsipyla grandella* (Lepidoptera: Pyralidae) larvae. Crop Prot. 19, 301-305.

- Mariotti, J.P., Tomi, F., Casanova, J., Costa, J. and Bernardini, A.F., 1997. Composition of the essential oil of *Cistus ladaniferus* L. cultivated in Corsica (France). *Flavour Fragr. J.* 12, 147-151.
- Martinez-Rossi, N.M. and Peres, N.T.A., 2008. Antifungal resistance mechanisms in dermatophytes. *Mycopathologia* 166, 369-383.
- Masango, P., 2005. Cleaner production of essential oils by steam distillation. *J. Clean. Prod.* 13, 833-839.
- Mbatchi, S.F., Mbatchi, B., Banzouzi, J.T., Bansimba, T., Nsonde Ntandou, G.F., Ouamba, J.-M., Berry, A. and Benoit-Vical, F., 2006. *In vitro* antiparasmodial activity of 18 plants used in Congo Brazzaville traditional medicine. *J. Ethnopharmacol.* 104, 168-174.
- Mechikova, G.Y., Stepanova, T.A., Kalinovskii, A.I., Ponomarenko, L.P. and Stonik, V.A., 2008. Flavonoids from *Vaccinium axillare* leaves. *Chem. Nat. Comp.* 44, 100-101.
- Mercan, A., Nicolas, J.-P. and Choktsang, L., 2007. Plantes himalayennes - *Rhodiola crenulata* et *Cordyceps sinensis* : allégations commerciales, aspects pharmacologiques et sociaux de deux nouvelles panacées himalayennes. *Ethnopharmacologia* 39, 22-35.
- Miceli, M.H., Diaz, J.A. and Lee, S.A., 2011. Emerging opportunistic yeast infections. *Lancet Infect. Dis.* 11, 142-151.
- Michel, P.F., 1986. Le doyen des arbres: le *Ginkgo biloba*. *La presse médicale* 15, 1450-1453.
- Miles, D.H., De Medeiros, J.M.R., Chittawong, V., Hedin, P.A., Swithenbank, C. and Lidert, Z., 1991. 3'-formyl-2',4',6'-trihydroxydihydrochalcone from *Psidium acutangulum*. *Phytochemistry* 30, 1131-1132.
- Mimaki, Y., Aoki, T., Jitsuno, M., Kiliç, C.S. and Coskun, M., 2008. Steroidal glycosides from the rhizomes of *Ruscus hypophyllum*. *Phytochemistry* 69, 729-737.
- Mishra, A.K. and Dubey, N.K., 1994. Evaluation of some essential oils for their toxicity against fungi causing deterioration of stored food commodities. *Appl. Environ. Microbiol.* 60, 1101-1105.
- Miyata, T., Harakuni, T., Sugawa, H., Sattabongkot, J., Kato, A., Tachibana, M., Torii, M., Tsuboi, T. and Arakawa, T., 2011. Adenovirus-vectored *Plasmodium vivax* ookinete surface protein, Pvs25, as a potential transmission-blocking vaccine. *Vaccine* 29, 2720-2726.
- Mocali, S. and Benedetti, A., 2010. Exploring research frontiers in microbiology: the challenge of metagenomics in soil microbiology. *Res. Microbiol.* 161, 497-505.
- Mohd Ridzuan, M.A.R., Sow, A., Noor Rain, A., Mohd Ilham, A. and Zakiah, I., 2007. *Eurycoma longifolia* extract-artemisinin combination: parasitemia suppression of *Plasmodium yoelii*-infected mice. *Trop. Biomed.* 24, 111-118.
- Moravcova, J., Capkova, J., Stanek, J. and Raich, I., 1997. Methyl-5-deoxy- α - and β -D-xylofuranosides. *J. Carbohydr. Chem.* 16, 1061-1073.

- Moretti, C., Deharo, E., Sauvain, M., Jardel, C., Timon David, P. and Gasquet, M., 1994. Antimalarial activity of cedronin. *J. Ethnopharmacol.* 43, 57-61.
- Mouchet, J., Nadire-Galliot, M., Gay, F., Poman, J.P., Lepelletier, L., Claustre, J. and Bellony, S., 1989. Le paludisme en Guyane - II. Les caractéristiques des différents foyers et la lutte antipaludique. *Bull. Soc. Path. Exo.* 82, 393-405.
- Mueller, M.S., Karhagomba, I.B., Hirt, H.-M. and Wemakor, E., 2000. The potential of *Artemisia annua* L. as a locally produced remedy for malaria in the tropics: agricultural, chemical and clinical aspects. *J. Ethnopharmacol.* 73, 487-493.
- Muhammad, I., Bedir, E., Khan, S.I., Tekwani, B.L., Khan, I.A., Takamatsu, S., Pelletier, J. and Walker, L.A., 2004. A new antimalarial quassinoid from *Simaba orinocensis*. *J. Nat. Prod.* 67, 772-777.
- Muhammad, I. and Samoylenko, V., 2007. Antimalarial quassinoids: past, present and future. *Expert Opin. Drug Discov.* 2, 1-19.
- Murakami, C., Fukamiya, N., Tamura, S., Okano, M., Bastow, K.F., Tokuda, H., Mukainaka, T., Nishino, H. and Lee, K.H., 2004. Multidrug-resistant cancer cell susceptibility to cytotoxic quassinoids, and cancer chemopreventive effects of quassinoids and canthin alkaloids. *Bioorg. Med. Chem.* 12, 4963-4968.
- Murakami, N., Huq, M.M., Tamura, S., Itagaki, S., Horii, T. and Kobayashi, M., 2001. New anti-malarial flavonol glycoside from *Hydrangeae dulcis* folium. *Bioorg. Med. Chem.* 11, 2445-2447.
- Nantitanon, W., Chowwanapoonpohn, S. and Okonogi, S., 2007. Antioxidant and antimicrobial activities of *Hyptis suaveolens* essential oil. *Sci. Pharm.* 75, 35-46.
- Nascimento, P.F.C., Nascimento, A.C., Rodrigues, C.S., Antonioli, A.R., Santos, P.O., Barbosa Junior, A.M. and Trindade, R.C., 2007. Atividade antimicrobiana dos óleos essenciais: uma abordagem multifatorial dos métodos. *Rev. Bras. Farmacogn. / Braz. J. Pharm. Sci.* 17, 108-113.
- Newman, D.J. and Cragg, G.M., 2007. Natural products as sources of new drugs over the last 25 years. *J. Nat. Prod.* 70, 461-477.
- Nguefack, J., Lekagne Dongmo, J.B., Dakole, C.D., Leth, V., Vismer, H.F., Torp, J., Guemdjom, E.F.N., Mbeffo, M., Tamgue, O., Fotio, D., Amvam Zollo, P.H. and Nkengfack, A.E., 2009. Food preservative potential of essential oils and fractions from *Cymbopogon citratus*, *Ocimum gratissimum* and *Thymus vulgaris* against mycotoxigenic fungi. *Int. J. Food Microbiol.* 131, 151-156.
- Nissen, L., Zatta, A., Stefanini, I., Grandi, S., Sgorbati, B., Biavati, B. and Monti, A., 2010. Characterization and antimicrobial activity of essential oils of industrial hemp varieties (*Cannabis sativa* L.). *Fitoterapia* 81, 413-419.
- Njar, V.C.O., Alao, T.O., Okogun, J.I., Raji, Y., Bolarinwa, A.F. and Nduka, E.U., 1995. Antifertility activity of *Quassia amara*. Quassin inhibits the steroidogenesis in rat Leydig cells *in vitro*. *Planta Med.* 61, 180-182.
- Novoa-Carballal, R., Fernandez-Megia, E., Jimenez, C. and Rigueira, R., 2011. NMR methods for unravelling the spectra of complex mixtures. *Nat. Prod. Rep.* 28, 78-98.

- Nucci, M. and Marr, K.A., 2005. Emerging fungal diseases. Clin. Infect. Dis. 41, 521-526.
- Nunes, J.M., Pinto, P.S., Bordignon, S.A.L., Rech, S.B. and Poser, G.L., 2010. Phenolic compounds in *Hypericum* species from the *Trigynobrathys* section. Biochem. Syst. Ecol. 38, 224-228.
- O'Neill, M.J., Bray, D.H., Boardman, P., Phillipson, J.D., Warhust, D.C., Peters, W. and Suffness, M., 1986. Plants as sources of antimalarial drugs: *in vitro* antimalarial activities of some quassinoids. Antimicrob. Agents Chemother. 30, 101-104.
- Odonne, G., 2010. Approche ethnopharmacologique comparative des traitements phytothérapeutiques de la leishmaniose en Amazonie. Application aux communautés Chayahuita (Pérou) et du haut et moyen Oyapock (Guyane française). Thèse de doctorat, Université des Antilles et de la Guyane, Cayenne.
- Odonne, G., Bourdy, G., Beauchêne, J., Houël, E., Stien, D., Chevolot, L. and Deharo, E., 2007. From tonic-cups to bitter-cups : *Kwasi bita beker* from Suriname. Determination, past and present use of an ancient galenic artefact. J. Ethnopharmacol. 110, 318-322.
- Oke, F., Aslim, B., Ozturk, S. and Altundag, S., 2009. Essential oil composition, antimicrobial and antioxidant activities of *Satureja cuneifolia* Ten. Food Chem. 112, 874-879.
- Okunade, A.L., Hufford, C.D. and Clark, A.M., 1997. Antimicrobial properties of the constituents of *Piper aduncum*. Phytother. Res. 11, 142-144.
- Olajide, O.A., Awe, S.O. and Makinde, J.M., 1999. Pharmacological studies on the leaf of *Psidium guajava*. Fitoterapia 70, 25-31.
- Oliva, B., Piccirilli, E., Ceddia, T., Pontieri, E., Aureli, P. and Ferrini, A.M., 2003. Antimycotic activity of *Melaleuca alternifolia* essential oil and its major components. Lett. Appl. Microbiol. 37, 185-187.
- Onawunmi, G.O., 1989. Evaluation of the antimicrobial activity of citral. Lett. Appl. Microbiol. 9, 105-108.
- ONF, 2004. Guide de reconnaissance des arbres de Guyane - 120 essences décrites, 2e édition, ONF Guyane (Ed), 374 p.
- Ortholand, J.-Y. and Ganesan, A., 2004. Natural products and combinatorial chemistry: back to the future. Curr. Opin. Chem. Biol. 8, 271-280.
- Owolabi, M.S., Ogundajo, A., Yusuf, K.O., Lajide, L., Villanueva, H.E., Tuten, J.A. and Setzer, W.N., 2010. Chemical composition and bioactivity of the essential oil of *Chromolaena odorata* from Nigeria. Rec. Nat. Prod. 4, 72-78.
- Pages, G., Delaurent, C. and Caldarelli, S., 2006. Simplified analysis of mixtures of small molecules by chromatographic NMR Spectroscopy. Angew. Chem. Int. Ed. 45, 5950-5953.
- Pan, S.-Y., Pan, S., Yu, Z.-L., Ma, D.-L., Chen, S.-B., Fong, W.-F., Han, Y.-F. and Ko, K.-M., 2010. New perspectives on innovative drug discovery: an overview. J. Pharm. Pharmaceut. J. 13, 450-471.

- Paradowska, K., Gubica, T., Temeriusz, A., Cyranski, M.K. and Wawer, I., 2008. ^{13}C CP MAS NMR and crystal structure of methyl glycopyranosides Carbohydr. Res. 343, 2299-2307.
- Parveen, S., Das, S., Kundra, C.P. and Pereira, B.M.J., 2003. A comprehensive evaluation of the reproductive toxicity of *Quassia amara* in male rats. Reprod. Toxicol. 17, 45-50.
- Pernoud, R., 1994. Hildegard de Bingen, Conscience inspirée du XII^e siècle. France Loisirs, Editions du Rocher, Paris, France, 195 p.
- Phillipson, J.D., Wright, C.W., Kirby, G.C. and Warhurst, D.C., 1993. Chapter 1 : Tropical plants as source of antiprotozoal agents. Phytochemical Potential of Tropical Plants. In: P.P. K.R. Downum, New-York (Ed.).
- Pichersky, E. and Gershenzon, J., 2002. The formation and function of plant volatiles: perfumes for pollinator attraction and defense. Curr. Opin. Plant Biol. 5, 237-243.
- Pierre, J., 1971. Qui a découvert la quinine et la cinchonine ? Revue d'Histoire de la Pharmacie 59, 342.
- Pina-Vaz, C., Gonçalves-Rodrigues, A., Pinto, E., Costa-de-Oliveira, S., Tavares, C., Salgueiro, L., Cavaleiro, C., Gonçalves, M.J. and Martinez-de-Oliveira, J., 2004. Antifungal activity of *Thymus* oils and their major compounds. JEADV 18, 73-78.
- Pinto, E., Pina-Vaz, C., Salgueiro, L., Gonçalves, M.J., Costa-de-Oliveira, S., Cavaleiro, C., Palmeira, A., Rodrigues, A. and Martinez-de-Oliveira, J., 2006. Antifungal activity of the essential oil of *Thymus pulegioides* on *Candida*, *Aspergillus* and dermatophyte species. J. Med. Microbiol. 55, 1367-1373.
- Pistelli, L., Cammilli, A., Manunta, A., Marsili, A. and Morelli, A., 1993. Triterpenoid saponins and flavonoid glycosides from *Bupleurum falcatum* subsp. *cernuum*. Phytochemistry 33, 1537-1539.
- Plotkin, M.J., 2001. Global phytochemistry: the ethnobotanist view. Phytochemistry 56, 117-120.
- Pluskal, T., Castillo, S., Villar-Briones, A. and Oresic, M., 2010. MZmine 2: Modular framework for processing, visualizing, and analyzing mass spectrometry-based molecular profile data. BMC Bioinformatics 11, 395-405.
- Pontes, W.J.T., De Oliveira, J.C.G., da Camara, C.A.G., Lopes, A.C.H.R., Gondim Junior, M.G.C., De Oliveira, J.V., Barros, R. and Schwartz, M.O.E., 2007. Chemical composition and acaricidal activity of the leaf and fruit essential oils of *Protium heptaphyllum* (Aubl.) Marchand (Burseraceae). Acta Amaz. 37, 103-110.
- Pourmortazavi, S.M. and Hajimirsadeghi, S.S., 2007. Supercritical fluid extraction in plant essential and volatile oil analysis. J. Chromatogr. A 1163, 2-24.
- Prabu, G.R., Gnanamani, A. and Sadulla, S., 2006. Guaijaverin – a plant flavonoid as potential antiplaque agent against *Streptococcus mutans*. J. Appl. Microbiol. 101, 487-495.
- Pradines, B., Dormoi, J., Briolant, S., Bogreau, H. and Rogier, C., 2010. La résistance aux antipaludiques. Revue Francophone des Laboratoires 422, 51-62.
- Price, R., 1979. Kwasimukamba's gambit. Bijdragen tot de Taal-, Land- en Volkenkunde 135, 151-169.

- Psota, V., Ourednickova, J. and Falta, V., 2010. Control of *Hoplocampa testudinea* using the extract from *Quassia amara* in organic apple growing. Hort. Sci. 37, 139-144.
- Puyn, M.-S. and Shin, S., 2006. Antifungal effects of the volatile oils from *Allium* plants against *Trichophyton* species and synergism of the oils with ketoconazole. Phytomedicine 13, 394-400.
- Quetin-Leclerc, J., 2002. Le voyage insolite de la plante au médicament. J. Pharm. Belg. 57, 11-20.
- Rahim, N., Gomes, D.J., Watanabe, H., Rahman, S.R., Chomvarin, C., Endtz, H.P. and Alam, M., 2010. Antibacterial Activity of *Psidium guajava* leaf and bark against multidrug-resistant *Vibrio cholerae*: implication for cholera control. Jpn. J. Infect. Dis. 63, 271-274.
- Raji, Y. and Bolarinwa, A.F., 1997. Antifertility activity of *Quassia amara* in male rats - *in vivo* study. Life Sci. 61, 1067-1074.
- Ramos, M.F.S., Siani, A.C., Tappin, M.R.R., Guimaraes, A.C. and da Silva Ribeiro, J.E.L., 2000. Essential oils from oleoresins of *Protium* spp. of the Amazon region. Flavour Fragr. J. 150, 383-387.
- Ratnajara, N., 2006. Fungal infections - causes and diagnosis. Hospital Pharmacist 13, 313-319.
- Rauber, C.S., Guterres, S.S. and Schapoval, E.E.S., 2007. LC determination of citral in *Cymbopogon citratus* volatile oil. J. Pharmaceut. Biomed. 37, 594-601.
- Rex, J.H., Nelson, P.W., Paetznick, V.L., Lozano-Chiu, M., Espinel-Ingroff, A. and Anaissie, A.J., 1998. Optimizing the correlation between results of testing *in vitro* and therapeutic outcome *in vivo* for fluconazole by testing critical isolates in a murine model of invasive candidiasis. AAC 42, 129-134.
- Ringwald, P., Mouboko Eboumbou, E.C., Bickii, J. and Basco, L.K., 1999. *In vitro* activities of pyronaridine, alone and in combination with other antimalarial drugs, against *Plasmodium falciparum*. AAC 43.
- Rios, J.L. and Recio, M.C., 2005. Medicinal plants and antimicrobial activity. J. Ethnopharmacol. 100, 80-84.
- Rios, J.L., Recio, M.C. and Villar, A., 1988. Screening methods for natural products with antimicrobial activity: a review of the literature. J. Ethnopharmacol. 23, 127-149.
- Robert, V. and Boudin, C., 2003. Biologie de la transmission homme-moustique du *Plasmodium*. Bull. Soc. Path. Exo. 96, 6-20.
- Roberts, D.T., Taylor, W.D. and Boyle, J., 2003. Guidelines for treatment of onychomycosis. Brit. J. Dermatol. 148, 402-410.
- Rodrigues, A.M.S., 2010. Analyse et valorisation bioinspirée des métabolites secondaires à l'origine de la durabilité naturelle des bois exploités de Guyane française, Thèse de doctorat, Université des Antilles et de la Guyane (UAG) - Universidade de Brasília (UnB), 268 p. , Brasília.

Rodrigues, A.M.S., Theodoro, P.N.E.T., Eparvier, V., Basset, C., Silva, M.R.R., Beauchêne, J., Espindola, L.S. and Stien, D., 2010. Search for antifungal compounds from the wood of durable tropical trees. J. Nat. Prod. 73, 1706-1707.

Rodriguez-Tuleda, J.L., Alcazar-Fuoli, L., Alastruey-Izquierdo, A., Monzon, A., Mellado, A. and Cuenca-Estrella, M., 2007. Time of incubation for antifungal susceptibility testing of *Aspergillus fumigatus*: Can MIC values be obtained at 24 Hours ? AAC 51, 4502-4504.

Ronse, A., 2001. A revision of *Otacanthus* Lindl. (Scrophulariaceae). Brittonia 53, 137-153.

Ronse, A., de Pooter, H.L. and De Proft, M., 1997. Essential oils of *Otacanthus*. Phytochemistry 46, 1365-1368.

Rosato, A., Vitali, C., De Laurentis, N., Armenise, D. and Milillo, M.A., 2007. Antibacterial effect of some essential oils administered alone or in combination with Norfloxacin. Phytomedicine 14, 727-732.

Rosato, A., Vitali, C., Gallo, D., Balenzano, L. and Mallamaci, R., 2008. The inhibition of *Candida* species by selected essential oils and their synergism with amphotericin B. Phytomedicine 15, 635-638.

Rüdiger, A.L., Siani, A.C. and Veiga Junior, V.F., 2007. The chemistry and pharmacology of the South America genus *Protium* Burm. f. (Burseraceae). Phcog. Rev. 1, 93-104.

Sabatier, D., 2002. Diversité du milieu forestier. In : Guyane ou le voyage écologique, Richard-Hansen, C., Le Guen, R. (Eds). Editions Roger Le Guenn, Garies, France, 431 p. (pp. 22-31).

Samuelsson, G. and Bohlin, L., 2009. Drugs of natural origin - A treatise of pharmacognosy. 6th revised edition, Swedish Pharmaceutical Press, Stockholm, Sweden, 776 p.

Sandusky, P. and Raftery, D., 2005. Use of selective TOCSY NMR experiments for quantifying minor components in complex mixtures: application to the metabonomics of amino acids in honey. Anal. Chem. 77, 2455-2463.

Santana, A., Ohashi, S., De Rosa, L. and Green, C.L., 1997. Brazilian rosewood oil - the prospect for sustainable production and oil quality management. Intern. J. Aromather. 8, 16-20.

Santos, D.A. and Hamdan, J.S., 2007. *In vitro* activities of four antifungal drugs against *Trichophyton rubrum* isolates exhibiting resistance to fluconazole. Mycoses 50, 286-289.

Santos, F.A., Rao, V.S.N. and Silveira, E.R., 1997. Anti-inflammatory and analgesic activities of the essential oil of *Psidium guianense*. Fitoterapia 68, 65-68.

Sarais, G., Cossu, M., Vargiu, S., Cabras, P. and Caboni, P., 2010. Liquid chromatography electrospray ionization tandem mass spectrometric determination of quassin and neoquassin in fruits and vegetables. J. Agric. Food Chem. 58, 2807-2811.

Savelev, S., Okello, E., Perry, N.S.L., Wilkins, R.M. and Perry, E.K., 2003. Synergistic and antagonistic interactions of anticholinesterase terpenoids in *Salvia lavandulaefolia* essential oil. Pharmacol. Biochem. Behav. 75, 661-668.

- Saxena, S. and Chaturvedi, P.K., 1992. A novel cardenolide, canarigenin-3-*O*- α -rhamnopyranosyl-(1-5)-*O*- β -D-xylofuranoside, from rhizomes of *Convallaria majalis*. J. Nat. Prod. 55, 39-42.
- Scher, J.M., Speakman, J.-B., Zapp, J. and Becker, H., 2004. Bioactivity guided isolation of antifungal compounds from the liverwort *Bazzania trilobata* (L.) S.F. Gray. Phytochemistry 65, 2583-2588.
- Schwob, I., Bessiere, J.-M., Masotti, V. and Viano, J., 2004. Changes in essential oil composition in Saint John's wort (*Hypericum perforatum* L.) aerial parts during its phenological cycle. Biochem. Syst. Ecol. 32, 735-745.
- Scott, M.P., 2007. Developmental genomics of the most dangerous animal. PNAS 104, 11865-11866.
- Shapiro, M.J. and Gounarides, J.S., 1999. NMR methods utilized in combinatorial chemistry research. Prog. Nucl. Magn. Reson. Spectrosc. 35, 153-200.
- Sharman, G.J., 1999. Development of a selective TOCSY experiment and its use in analysis of a mixture of related compounds. Chem. Commun., 1319-1320.
- Shin, S. and Lim, S., 2004. Antifungal effects of herbal essential oils alone and in combination with ketoconazole against *Trichophyton* spp. J. Appl. Microbiol. 97, 1289-1296.
- Siani, A.C., Garrido, I.S., Monteiro, S.S., Carvalho, E.S. and Ramos, M.F.S., 2004. *Protium icariba* as a source of volatile essences. Biochem. Syst. Ecol. 32, 477-489.
- Siani, A.C., Ramos, M.F.S., Menezes-de-Lima Jr., O., Ribeiro-dos-Santos, R., Fernandez-Ferreira, E., Soares, R.O.A., Rosas, E.C., Susunaga, G.S., Guimaraes, A.C., Zoghbi, M.G.B. and Henriques, M.G.M.O., 1999. Evaluation of anti-inflammatory-related activity of essential oils from the leaves and resin of species of *Protium*. J. Ethnopharmacol. 66, 57-69.
- Silva, D.R., Endo, E.H., Filho, B.P.D., Nakamura, C.V., Svidzinski, T.I.E., de Souza, A., Young, M.C.M., Ueda-Nakamura, T. and Cortez, D.A.G., 2009a. Chemical composition and antimicrobial properties of *Piper ovatum* Vahl. Molecules 14, 1171-1182.
- Silva, F.M., Paula, J.E. and Espindola, L.S., 2009b. Evaluation of the antifungal potential of Brazilian Cerrado medicinal plants. Mycoses 52, 511-517.
- Simirgiotis, M.J., Adachi, S., To, S., Yang, H., Reynertson, K.A., Basile, M.J., Gil, R.R., Weinstein, I.B. and Kennelly, E.J., 2008. Cytotoxic chalcones and antioxidants from the fruits of *Syzygium samarangense* (Wax Jambu) Food Chem. 107, 831-819.
- Simmonds, M.S.J., 2003. Novel drugs from botanical sources. Drug Discovery Today 8, 721-722.
- Simons, V., Morrissey, J.P., Latjnhouwers, M., Csukai, M., Cleaver, A., Yarrow, C. and Osbourn, A., 2006. Dual effects of plant steroidal alkaloids on *Saccharomyces cerevisiae*. AAC 50, 2732-2740.
- Singh, B., Sung, L.K., Matusop, A., Radharkrishnan, A., Shamsul, S.S.G., Cox-Singh, J., Thomas, A. and Conway, D., 2004. A large focus of naturally acquired *Plasmodium knowlesi* infections in human beings. Lancet 363, 1017-1024.

Sriwilaijaroen, N., Kondo, S., Nanthasri, P., Auparakkitanon, S., Suzuki, Y. and Wilairat, P., 2010. Antiplasmodial effects of *Brucea javanica* (L.) Merr. and *Eurycoma logifolia* Jack extracts and their combination with chloroquine and quinine on *Plasmodium falciparum* in culture. Trop. Med. Health 38, 61-68.

Stark, T., Bareuther, S. and Hofman, T., 2005. Sensory-guided decomposition of roasted cocoa nibs (*Theobroma cacao*) and structure determination of taste-active polyphenols. J. Agric. Food Chem. 53, 5407-5418.

Sticher, O., 1993. Quality of *Ginkgo* preparations. Planta Med. 59, 2-11.

Sticher, O., Meier, B. and Hasler, A., 2000. The analysis of ginkgo flavonoids. In: *Ginkgo Biloba*, A. van Beek (Ed), Harwood Academic Publishers, pp. 179-202.

Stojkovic, S., Petrovic, S., Kubic, J., Dzamic, A., Ristic, M., Milenkovic, M., Glamoclija, J., Sokovic, M.D. and Stojkovic, D., 2009. Chemical composition and antimicrobial and antioxydant activity of *Seseli rigidum* flower essential oil. Chem. Nat. Comp. 45, 253-253.

Su, Y.-C., Ho, C.-L., Wang, E.I.-C. and Chang, S.-T., 2006. Antifungal activities and chemical compositions of essential oils from leaves of four Eucalypts. Taiwan J. For. Sci. 21, 49-61.

Svetaz, L., Zuljan, F., Derita, M., Petenatti, E., Tamayos, G., Caceres, A., Cechinel Filho, V., Gimenez, A., Pinzon, R., Zacchino, S. and Gupta, M.P., 2010. Value of the ethnomedical information for the discovery of plants with antifungal properties. A survey among seven Latin American countries. J. Ethnopharmacol. 127, 137-158.

Tajkarimi, M.M., Ibrahim, S.A. and Cliver, D.O., 2010. Antimicrobial herb and spice compounds in food. Food Control 21, 1199-1218.

Tavares, A.C., Gonçalves, M.J., Cruz, M.T., Cavaleiro, C., Lopes, M.C., Canhoto, J. and Salgueiro, L.R., 2010. Essential oils from *Distichoselinum tenuifolium*: Chemical composition, cytotoxicity, antifungal and anti-inflammatory properties. J. Ethnopharmacol. 130, 593-598.

Theodoridis, G., Laskaris, G., de Jong, C.F., Hofte, A.J.P. and Verpoorte, R., 1998. Determination of paclitaxel and related diterpenoids in plant extracts by high-performance liquid chromatography with UV detection in high-performance liquid chromatography-mass spectrometry. J. Chromatogr. A 802, 297-305.

Toma, W., Gracioso, J.S., Andrade, F.D.P., Hiruma-Lima, C.A., Vilegas, W. and Souza Brito, A.R.M., 2002. Antiulcerogenic activity of four extracts obtained from the bark wood of *Quassia amara* L. (Simaroubaceae). Biol. Pharm. Bull. 25, 1151-1155.

Toma, W., Gracioso, J.S., Hiruma-Lima, C.A., Andrade, F.D.P., Vilegas, W. and Souza Brito, A.R.M., 2003. Evaluation of the analgesic and antiedematogenic activities of *Quassia amara* bark extract. J. Ethnopharmacol. 85, 19-23.

Torres-Mendoza, D., Gonzalez, J., Ortega-Barria, E., Heller, M.V., Capson, T.L., McPhail, K., Gerwick, W.H. and Cubilla-Rios, L., 2006. Weakly antimalarial flavonol arabinofuranosides from *Calycolpus warszewiczianus*. J. Nat. Prod. 69, 826-828.

Trager, W. and Jensen, E., 1976. Human malaria parasites in continuous culture. Science 193, 673-675.

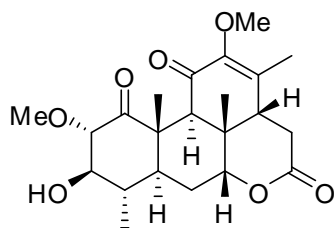
- Tserennadmid, R., Tako, M., Galgoczy, L., Papp, T., Pesti, M., Vagvolgyi, C., Almassy, K. and Krisch, J., 2011. Anti-yeast activities of some essential oils in growth medium, fruit juices and milk. *Int. J. Food Microbiol.* 114, 480-486.
- Tzortzakis, N.G. and Economakis, C.D., 2007. Antifungal activity of lemongrass (*Cymbopogon citratus* L.) essential oil against key postharvest pathogens. *Innov. Food Sci. Emerg.* 8, 253-258.
- Unsicker, S.B., Kunert, G. and Gershenzon, J., 2009. Protective perfumes: the role of vegetative volatiles in plant defense against herbivores. *Curr. Opin. Plant Biol.* 12, 479-485.
- Urdang, G., 1951. The development of pharmacopoeias - A review with special reference to the Pharmacopoea Internationalis. *Bull. Org. mond. Santé / Bull. World Hlth Org.* 4, 577-603.
- Valadeau, C., 2010. De l'ethnobotanique à l'articulation du soin : une approche anthropologique du système nosologique chez les Yanéscha de Haute Amazonie péruvienne. Thèse de doctorat, Université de Toulouse, Toulouse, p. 381.
- Valenta, Z., Papadopoulos, S. and Podesva, C., 1961. Quassin and neoquassin. *Tetrahedron* 15, 100-110.
- Velickovic, D.T., Randjelovic, N.V., Ristic, M.S., Smelcerovic, A.A. and Velickovic, A.S., 2002. Chemical composition and antimicrobial action of the ethanol extracts of *Salvia pratensis* L., *Salvia glutinosa* L. and *Salvia aethiopis* L. *J. Serb. Chem. Soc.* 67, 639-646.
- Venkatesan, P., Perfect, J.R. and Myers, S.A., 2005. Evaluation and management of fungal infections in immunocompromised patients. *Dermatol. Ther.* 18, 44-57.
- Verma, N., Tripathi, S.K., Sahu, D., Das, H.R. and Das, R.H., 2010. Evaluation of inhibitory activities of plant extracts on production of LPS-stimulated pro-inflammatory mediators in J774 murine macrophages. *Mol. Cell. Biochem.* 336, 127-135.
- Verpoorte, R., 1998. Exploration of nature's chemodiversity: the role of secondary metabolites as leads in drug development. *Drug Discovery Today* 3, 232-238.
- Verpoorte, R., Choi, Y.H. and Kim, H.K., 2007. NMR-based metabolomics at work in phytochemistry. *Phytochem. Rev.* 6, 3-14.
- Vial-Debas, C., 1996. De la grume au linalol : une interface écologie-économie. La forêt en jeu - l'extractivisme en Amazonie centrale Editions Orstom-Unesco (Laure Empereur Editeur - Paris), 179-187.
- Vigneron, M., Deparis, X., Deharo, E. and Bourdy, G., 2005. Antimalarial remedies in French Guiana: A knowledge attitudes and practices study. *J. Ethnopharmacol.* 98, 351-360.
- Vila, R., Santana, A.I., Pérez-Rosés, R., Valderrama, A., Castelli, M.V., Mendonça, S., Zacchino, S., Gupta, M.P. and Canigueral, S., 2010. Composition and biological activity of the essential oil from leaves of *Plinia cerrocampaensis*, a new source of α -bisabolol. *Biores. Tech.* 101, 2510-2514.

- Vitanyi, G., Bihatsi-Karsai, E., Lefler, J. and Lelik, L., 1997. Application of high performance liquid chromatography/mass spectrometry with thermospray ionization to the detection of quassinoids extracted from *Quassia amara* L.. Rapid. Commun. Mass Spectrom. 11, 691-693.
- Vvedenskaya, I.O., Rosen, R.T., Guido, J.E., Russell, D.J., Mills, K.A. and Vorsa, N., 2004. Characterization of flavonols in Cranberry (*Vaccinium macrocarpon*) powder. J. Agric. Food Chem. 52, 188-195.
- Wainwright, M. and Amaral, L., 2005. The phenothiazinium chromophore and the evolution of antimalarial drugs. Trop. Med. Int. Health 10, 501-511.
- Wall, M.E. and Wani, M.C., 1996. Camptothecin and taxol: from discovery to clinic. J. Ethnopharmacol. 51, 239-254.
- Wambebe, C., Khamofu, H., Momoh, J.A.F., Ekpeyongi, M., Audu, B.S., Njokus, O.S., Bamgboye, E.A., Nasipuri, R.N., Kunle;O.O., Okogun, J.I., Enwerem, M.N., Audam, J.G., Gamaniel, K.S., Obodozie, O.O., Samuel, B., JFojule, G. and Ogunyale, O., 2001. Double-blind, placebo-controlled, randomised cross-over clinical trial of NIPRISAN® in patients with sickle cell disorder. Phytomedicine 8, 252-261.
- Wang, L.M., Li, M.T., Jin, W.W., Li, S., Zhang, S.Q. and Yu, L.J., 2009. Variations in the components of *Osmanthus fragrans* Lour. essential oil at different stages of flowering. Food Chem. 114, 233-236.
- Wannissorn, B., Jarikasem, S., Siriwangchai, T. and Thubthimthed, S., 2005. Antibacterial properties of essential oils from Thai medicinal plants. Fitoterapia 76, 233-236.
- Ward, J.L., Harris, C., Lewis, J. and Beale, M.H., 2003. Assessment of ¹H NMR spectroscopy and multivariate analysis as a technique for metabolite fingerprinting of *Arabidopsis thaliana*. Phytochemistry 62, 949-957.
- Warnock, D., 2007. Trends in the epidemiology of invasive fungal infections. Jpn. J. Med. Mycol. 48, 1-12.
- Watanabe, M., 1998. Catechins as antioxidants from Buckwheat (*Fagopyrum esculentum* Moench) Groats. J. Agric. Food Chem. 46, 839-845.
- Weckwerth, W. and Morgenthal, K., 2005. Metabolomics: from pattern recognition to biological interpretation. Drug Discovery Today 10, 1551-1558.
- Weitzman, I. and Summerbell, R.C., 1995. The dermatophytes. Clin. Microbiol. Rev. 8, 240-259.
- Weyerstahl, P., Marschall, H., Seelmann, I. and Rustaiyan, A., 1997. Constituents of the essential oil of *Achillea eriophora* DC. Flavour Fragr. J. 12, 71-78.
- Weyerstahl, P., Marschall, H., Weirauch, M., Thefeld, K. and Surburg, H., 1998. Constituents of commercial Labdanum oil. Flavour Fragr. J. 13, 295-318.
- White, R.L., Burgess, D., Manduru, M. and Bosso, J., 1996. *In vitro* susceptibility testing in fungi: a global perspective on a variety of methods. AAC 40, 1914-1918.

- White, T.C., Marr, K.A. and Bowden, R.A., 1998. Clinical, cellular, and molecular factors that contribute to antifungal drug resistance. *Clin. Microbiol. Rev.* 11, 382-402.
- Willcox, M.L., Bodeker, G., Bourdy, G., Dhingra, V., Falquet, J., Ferreira, J.F.S., Graz, B., Hirt, H.-M., Hsu, E., de Magalhaes, P.M., Provendier, D. and Wright, C.W., 2004. *Artemisia annua* as a traditional herbal antimalarial In: M.L. Traditional medicinal plants and malaria. Willcox, Bodeker, G., Rasoanaivo, P. ed., Boca Raton, CRC Press (Ed.).
- Williamson, E.M., 2001. Synergy and other interactions in phytomedicines. *Phytomedicine* 8, 401-409.
- Wilson, P.G., O'Brien, M.M., Gadek, P.A. and Quinn, C.J., 2001. Myrtaceae revisited: a reassessment of infrafamilial groups. *Am. J. Bot.* 88, 2013-2025.
- Wilson, P.G., O'Brien, M.M., Heslewood, M.M. and Quinn, C.J., 2005. Relationships within Myrtaceae *sensu lato* based on a matK phylogeny. *Plant Syst. Evol.* 251, 3-19.
- Wink, M., 2003. Evolution of secondary metabolites from an ecological and molecular phylogenetic perspective. *Phytochemistry* 64, 3-19.
- Wright, C.W., 2005. Traditional antimalarials and the development of novel antimalarial drugs. *J. Ethnopharmacol.* 100, 67-71.
- Wright, C.W., O'Neill, M.J., Phillipson, J.D. and Warhurst, D.C., 1988. Use of microdilution to assess *in vitro* antiamoebic activities of *Brucea javanica* fruits, *Simarouba amara* stem, and a number of quassinoids. *Antimicrob. Agents Chemother.* 32, 1725-1729.
- Xue, Z.J., Chen, P., Peng, S.Y. and Li, Y.C., 2006. Synthesis and determination of absolute configuration of tetracetate 4 α -carba-D-xylofuranoside. *Tetrahedron* 62, 199-204.
- Yen, T.-B. and Chang, S.-T., 2008. Synergistic effects of cinnamaldehyde in combination with eugenol against wood decay fungi. *Biores. Tech.* 99, 232-236.
- Yiqing, Z., 2009. Ancient Chinese anti-fever cure becomes panacea for malaria. *Bull. World Health Organ.* 87, 743-744.
- Zhou, B.L., 2000. Bio-inspired study of structural materials. *Mater. Sci. Eng.* 11, 13-18.

Annexes

Annexe 1 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H , ^{13}C (Jmod), HMQC, HMBC, COSY et NOESY de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2-O-methylpicrasine B) dans le CD_3CN



$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_7$

$M = 406,47$

Temps de rétention : $T_r = 6,5$ min (Supelco Discovery® C18, 15 cm x 21,2 mm, 5 μm , gradient eau-acétonitrile 70:30 à 50:50 en 10 min, puis 50:50 à 0:100 en 5 min, débit 1 ml/min).

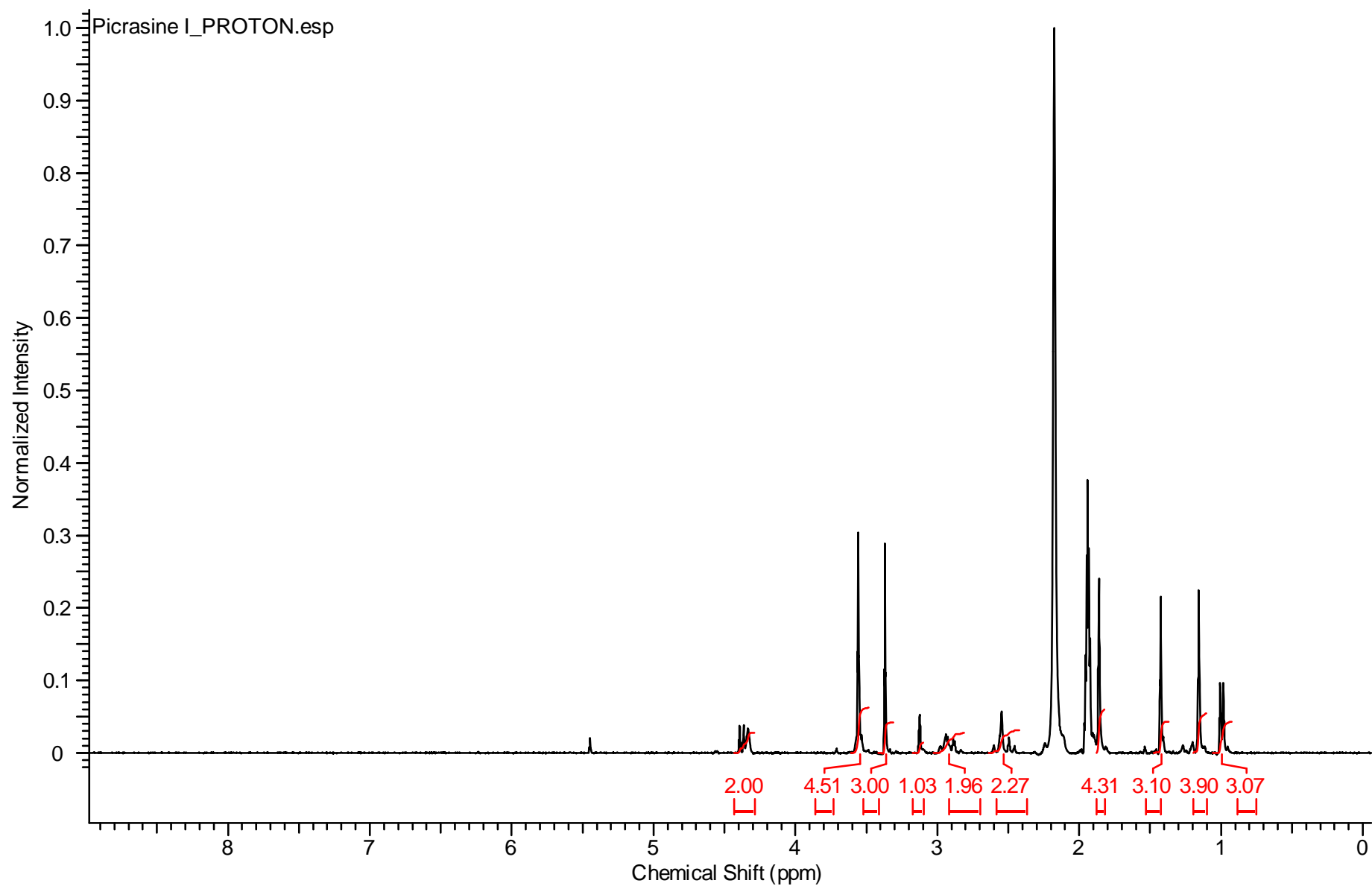
UV, λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) : 252,3 nm

$[\alpha]^{18}_{\text{D}} = -25$ (c 0,2 ; MeOH)

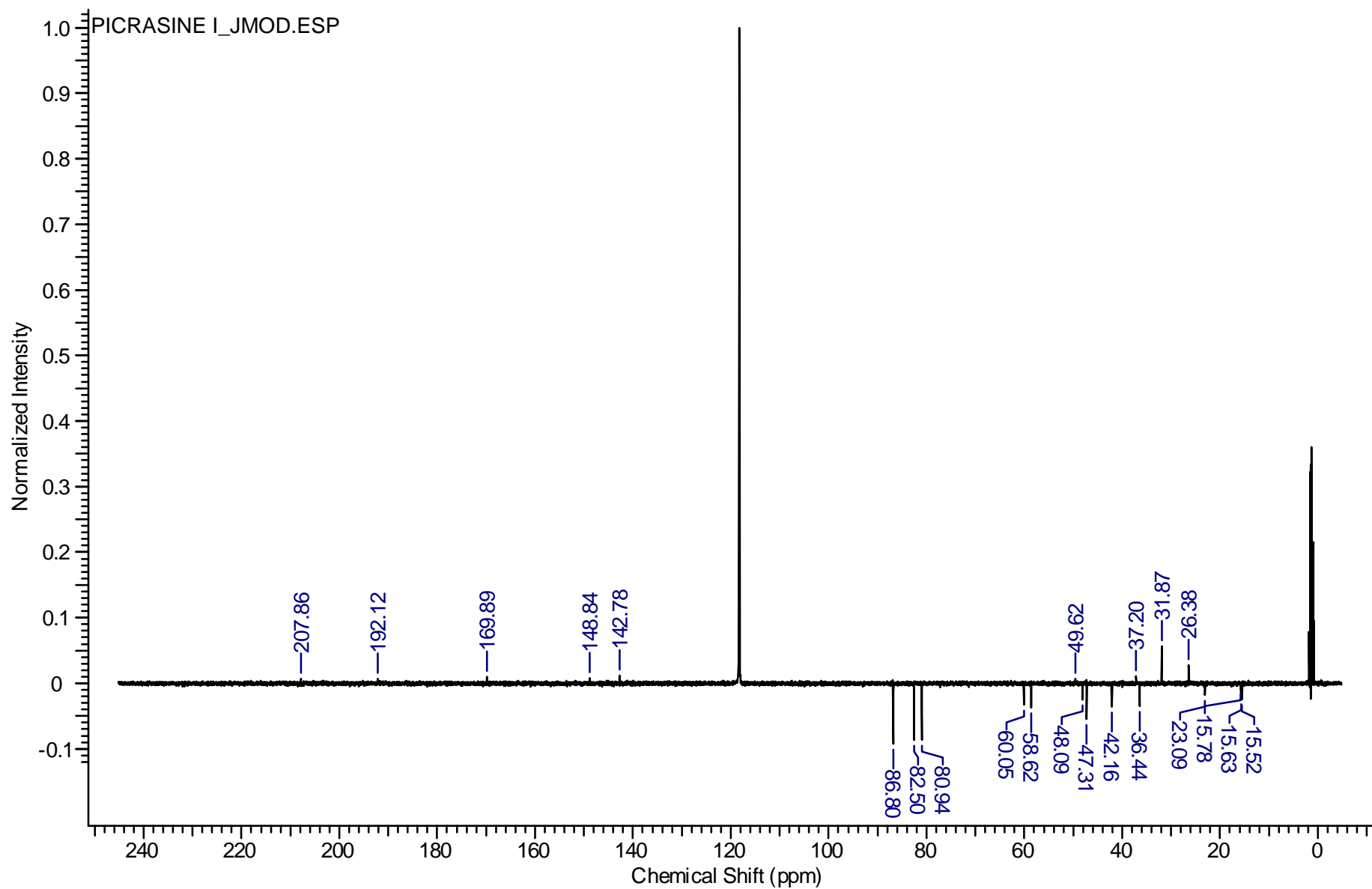
HRMS calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_7^+$ (MH^+) 407,2064, mesuré 407,2060; HRMS calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{NO}_7^+$ (MNH_4^+) 424,2329, trouvé 424,2327

RMN ^1H (500 MHz, CD_3CN) δ ppm 4,38 (1H, d, $J = 8,9$ Hz, H2), 4,33 (1H, t, $J = 2,8$ Hz, H7), 3,55 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-\text{C12}$), 3,54 (1H, d, $J = 3,7$ Hz, $\text{HO}-\text{C3}$), 3,36 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-\text{C2}$), 3,12 (1H, s, H9), 2,91 (1H, dd, $J = 17,2$; 5,6 Hz, H15eq), 2,57 (1H, dd, $J = 11,9$; 5,6 Hz, H14), 2,51 (1H, dd, $J = 17,2$; 11,9 Hz, H15ax), 1,96 (1H, m, H6), 1,91 (1H, m, H4), 1,88 (1H, m, H6), 1,86 (3H, s, Me21), 1,43 (3H, s, Me19), 1,16 (1H, m, H5), 1,15 (3H, s, Me20), 1,00 (3H, d, $J = 6,4$, Me18).

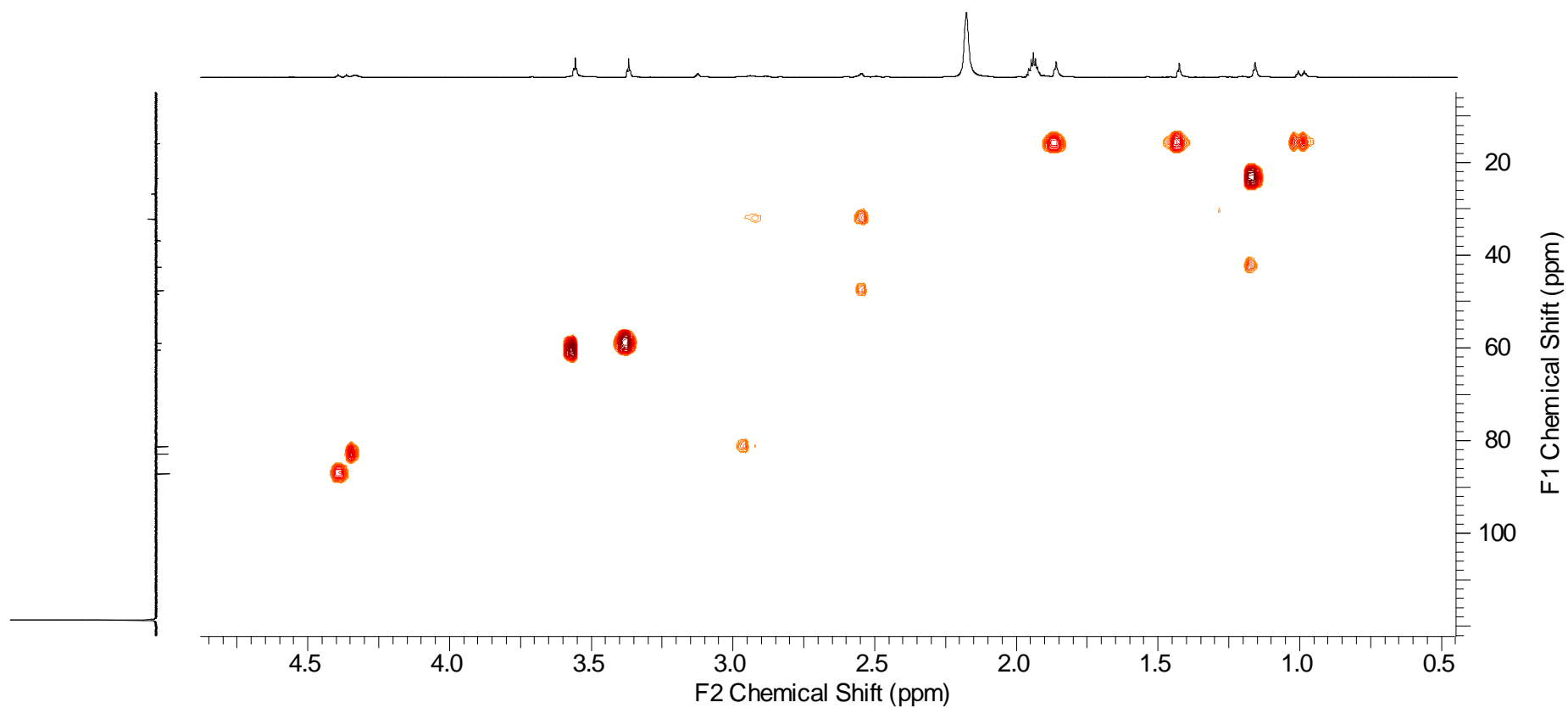
RMN ^{13}C (125,8 MHz, CD_3CN) δ ppm 207,8 (C1), 192,1 (C11), 169,9 (C16), 148,8 (C12), 142,8 (C13), 86,8 (C2), 82,5 (C7), 80,9 (C3), 60,0 ($\text{CH}_3\text{O}-\text{C12}$), 58,6 ($\text{CH}_3\text{O}-\text{C2}$), 49,6 (C10), 48,1 (C9), 47,3 (C14), 42,2 (C5), 37,2 (C8), 36,4 (C4), 31,9 (C15), 26,4 (C6), 23,0 (Me20), 15,7 (Me21), 15,6 (Me19), 15,5 (Me18).



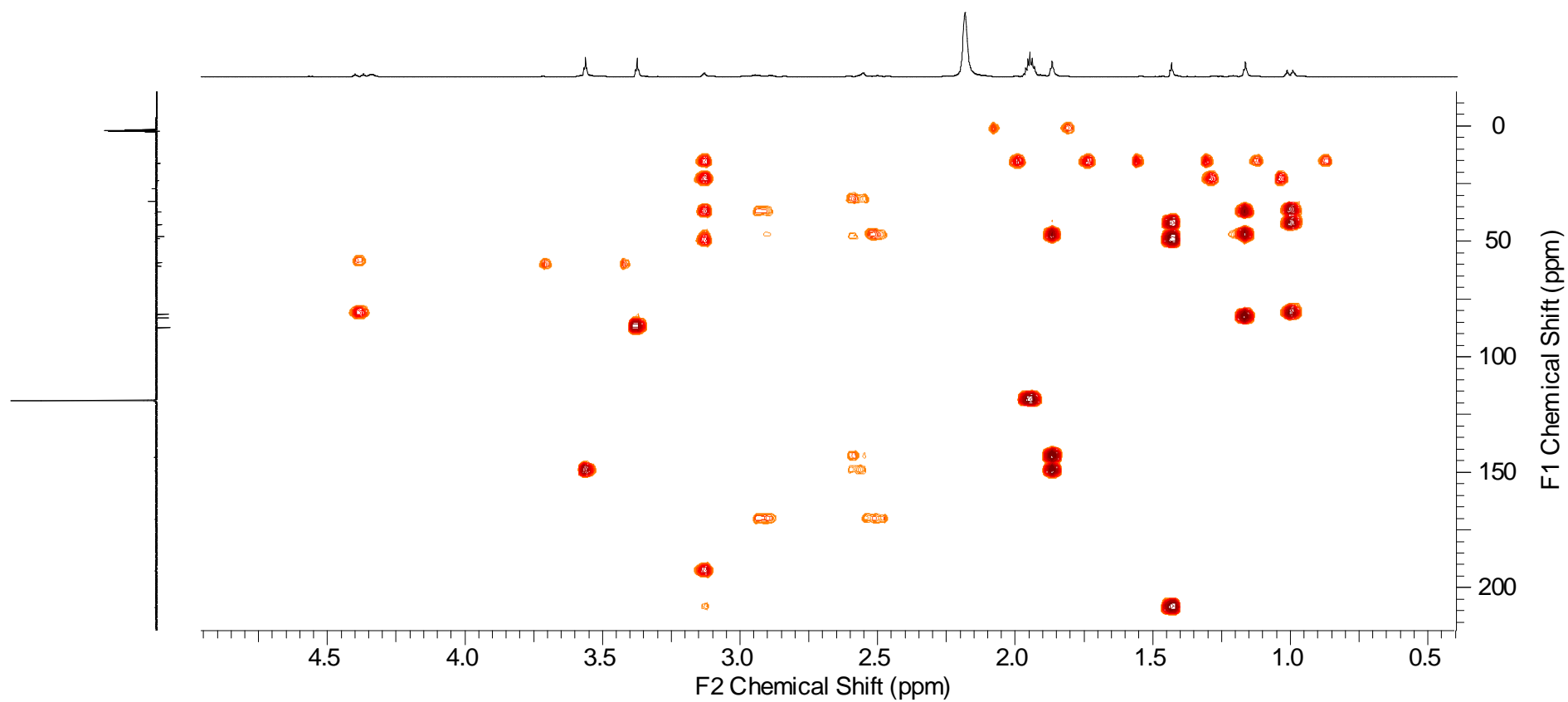
Spectre de RMN ^1H de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2-O-methylpicrasine B) dans le CD_3CN



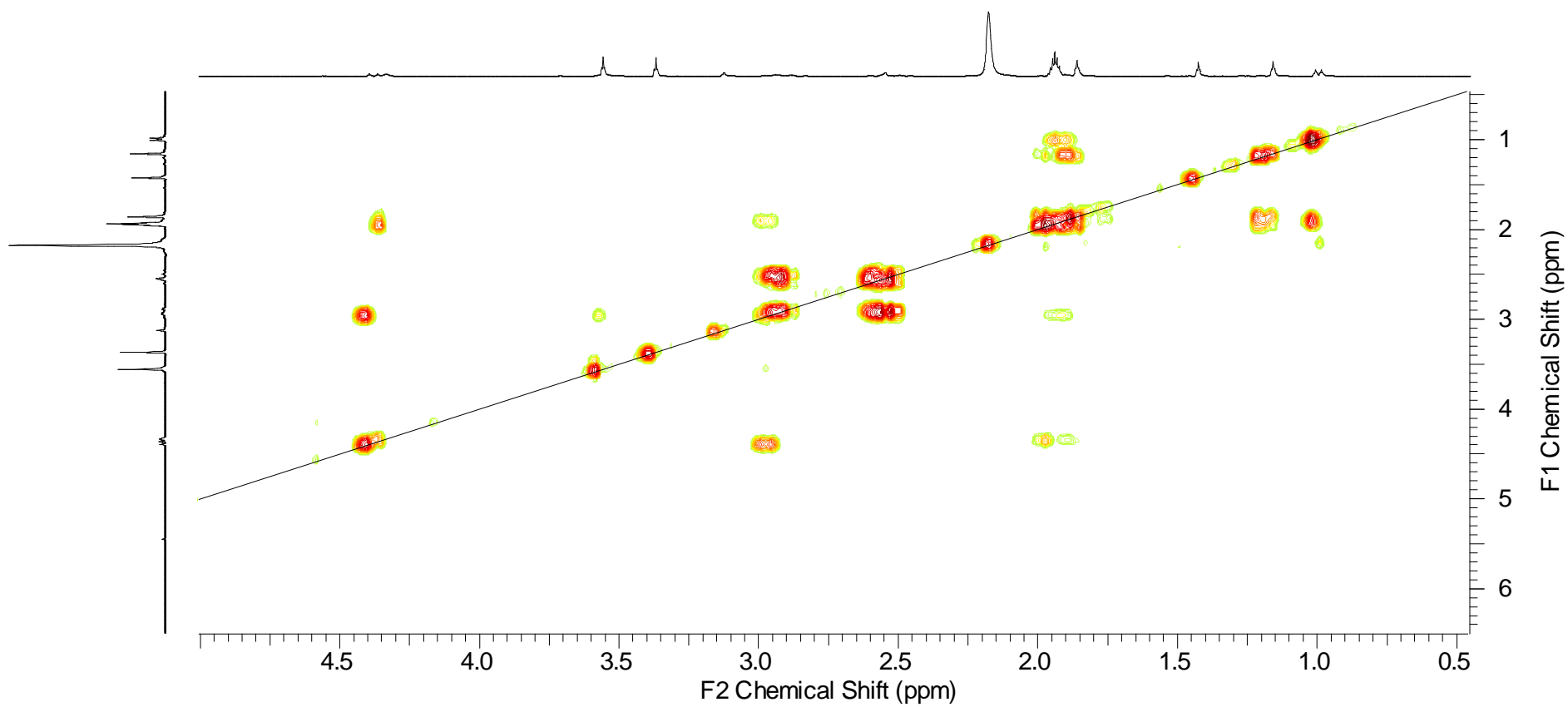
Spectre de RMN ^{13}C (Jmod) de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2-O-methylpicrasine B) dans le CD_3CN



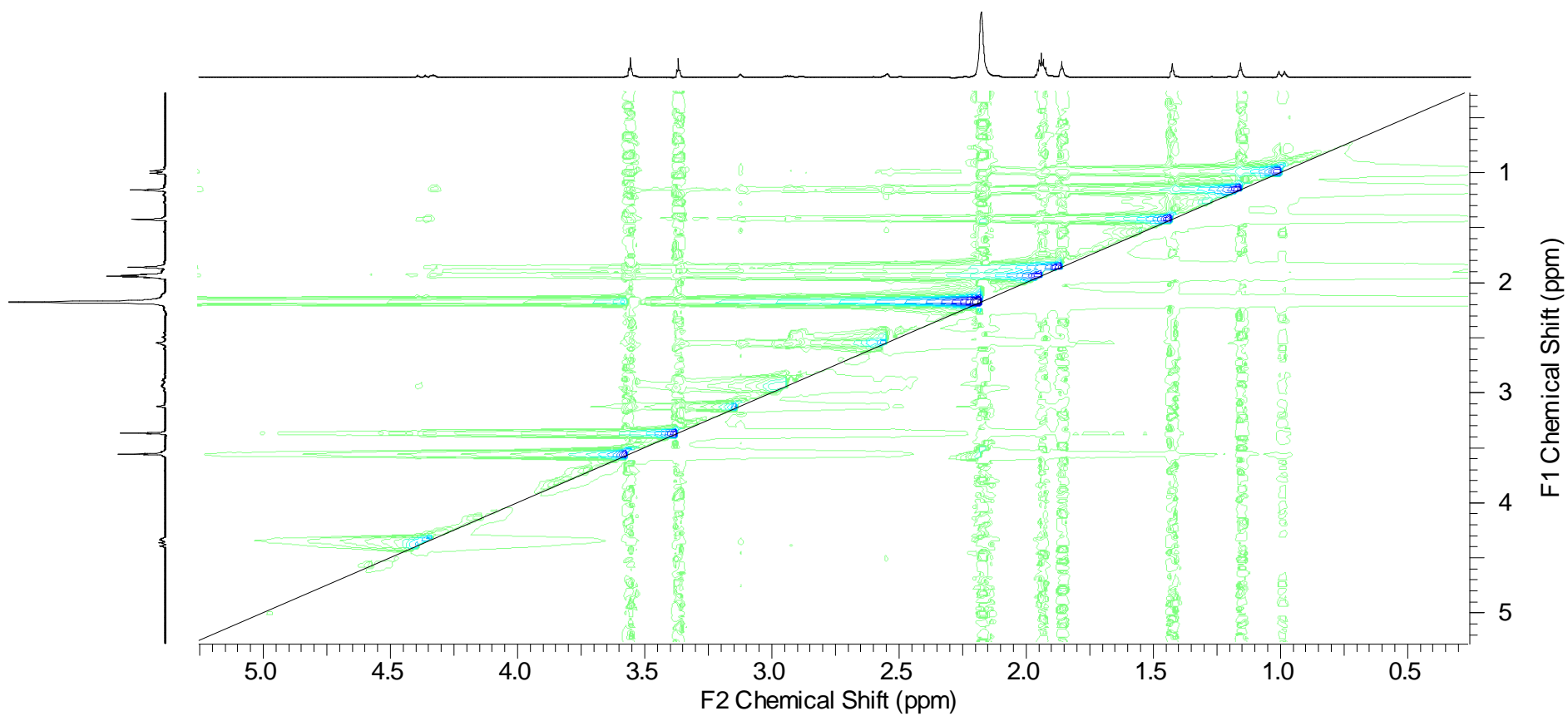
Spectre de RMN HMQC de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2-O-methylpicrasine B) dans le CD_3CN



Spectre de RMN HMBC de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2-O-methylpicrasine B) dans le CD_3CN

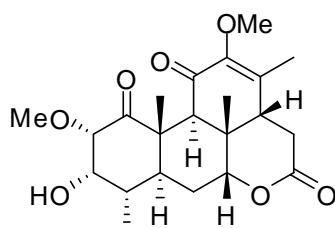


Spectre de RMN COSY de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2-O-methylpicrasine B) dans le CD₃CN



Spectre de RMN NOESY de la picrasine I (3R-3-hydroxy-2-*O*-methylpicrasine B) dans le CD₃CN

Annexe 2 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H , ^{13}C , HMQC, HMBC, COSY et NOESY de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2-O-methylpicrasine B) dans le CDCl_3



$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_7$

$M = 406,47$

Temps de rétention : Tr = 7,2 min (Supelco Discovery® C18, 15 cm x 21,2 mm, 5 μm , gradient eau-acétonitrile 70:30 à 50:50 en 10 min, puis 50:50 à 0:100 en 5 min, débit 1 ml/min).

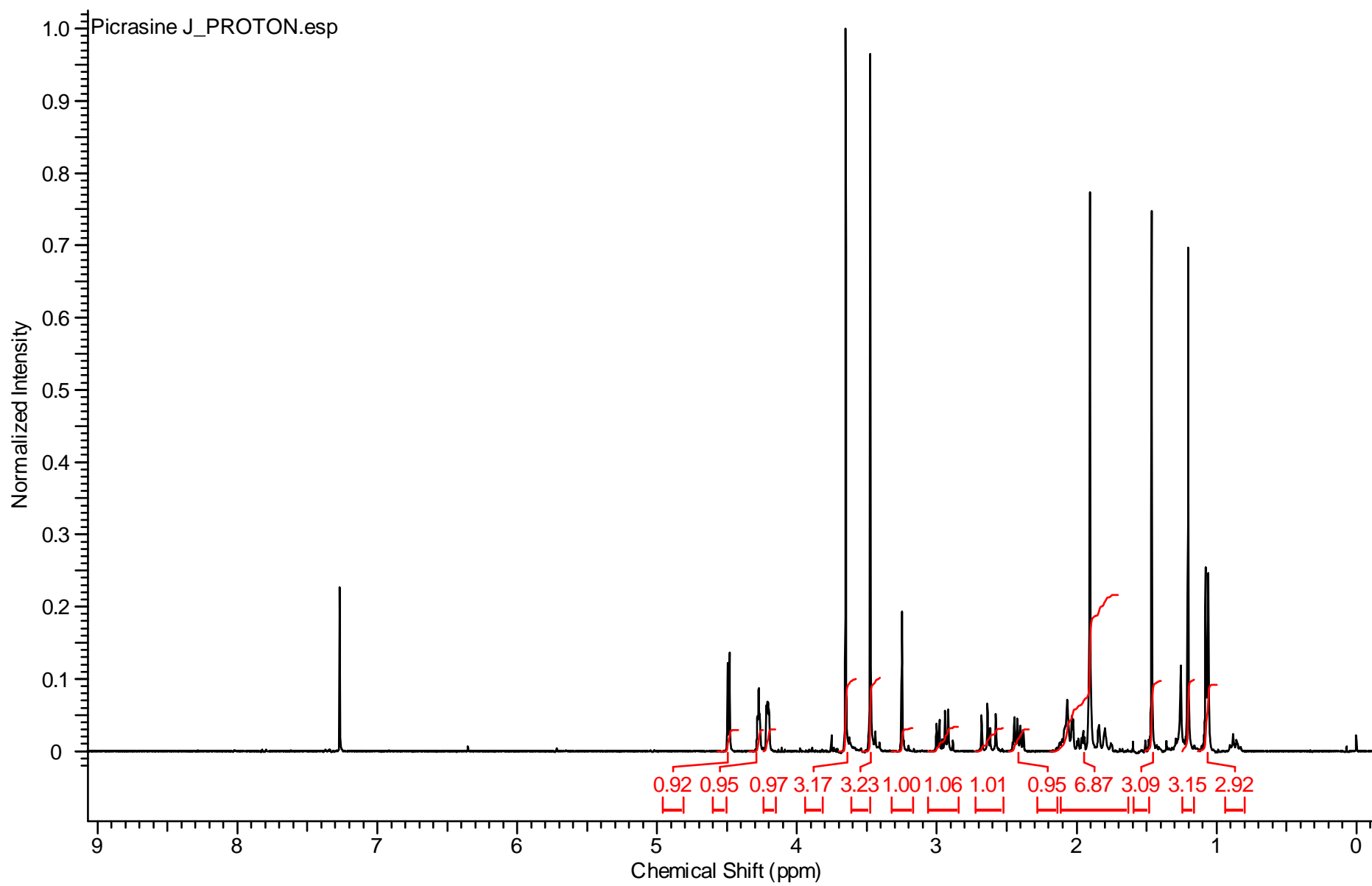
UV, λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) : 252,3 nm

$[\alpha]_{\text{D}}^{18} = -22$ (c 0,6; MeOH)

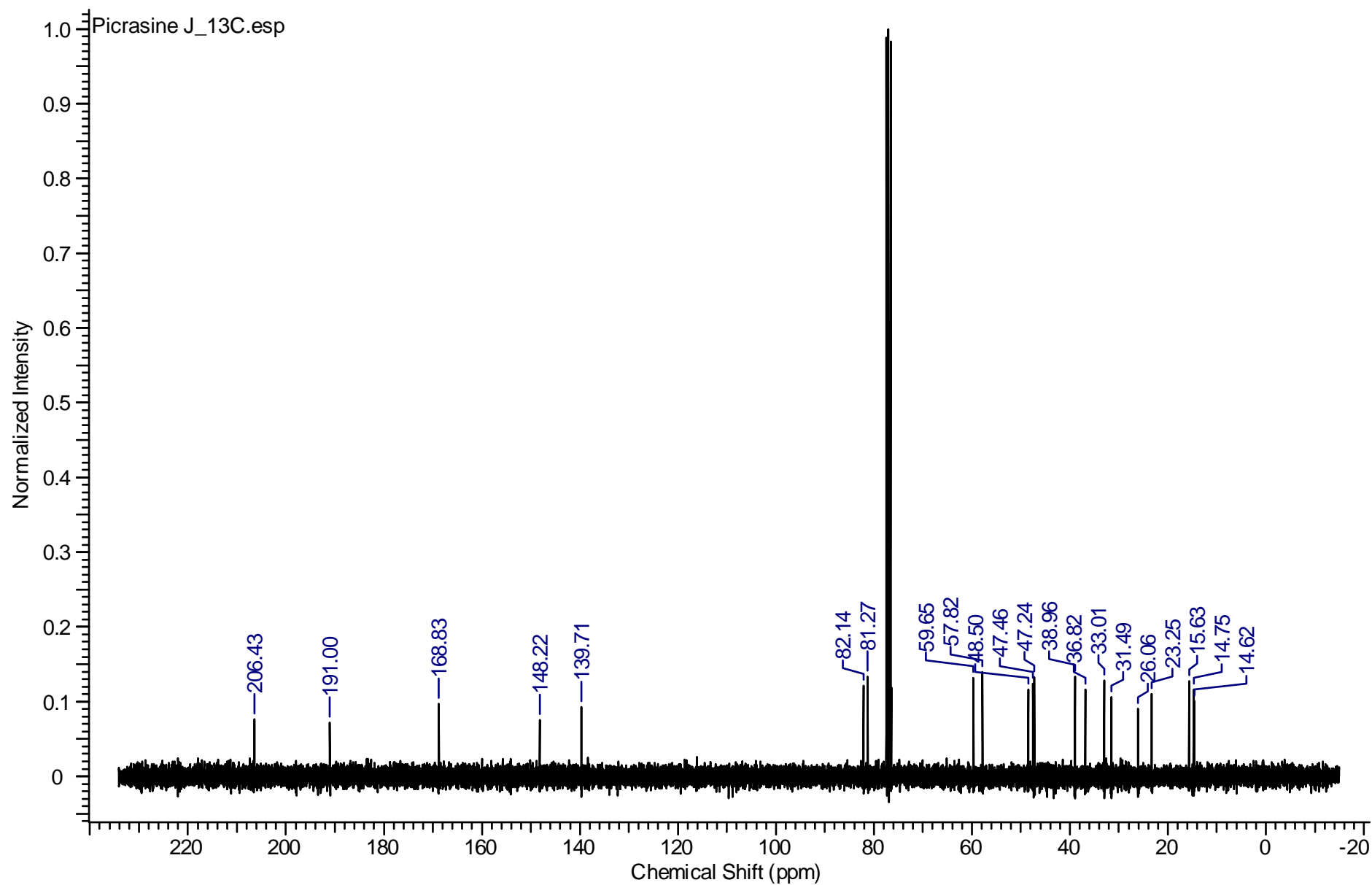
HRMS calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{31}\text{O}_7^+$ (MH^+) 407,2064, mesuré 407,2073; HRMS calculé pour $\text{C}_{22}\text{H}_{34}\text{NO}_7^+$ (MNH_4^+) 424,2329, trouvé 424,2327

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 4,48 (1H, d, $J = 3,8$ Hz, H2), 4,26 (1H, brt, $J = 2,5$ Hz, H7), 4,20 (1H, dd, $J = 3,6$; 1,8 Hz, H3), 3,64 (1H, s, HO-C3), 3,46 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O-C2}$), 3,24 (1H, s, H9), 2,93 (1H, dd, $J = 18,3$; 6,4 Hz, H15 $_{eq}$), 2,62 (1H, dd, $J = 18,3$; 12,4 Hz, H15 $_{ax}$), 2,40 (1H, dd, $J = 12,4$; 6,4, H14), 2,05 (1H, m, H4), 2,03 (1H, td, $J = 11,5$; 2,7, H5), 1,91 (1H, m, H6 $_{eq}$), 1,90 (3H, s, Me21), 1,81 (1H, m, H6 $_{ax}$), 1,45 (3H, s, Me19), 1,19 (3H, s, Me20), 1,06 (3H, d, $J = 6,2$, Me18).

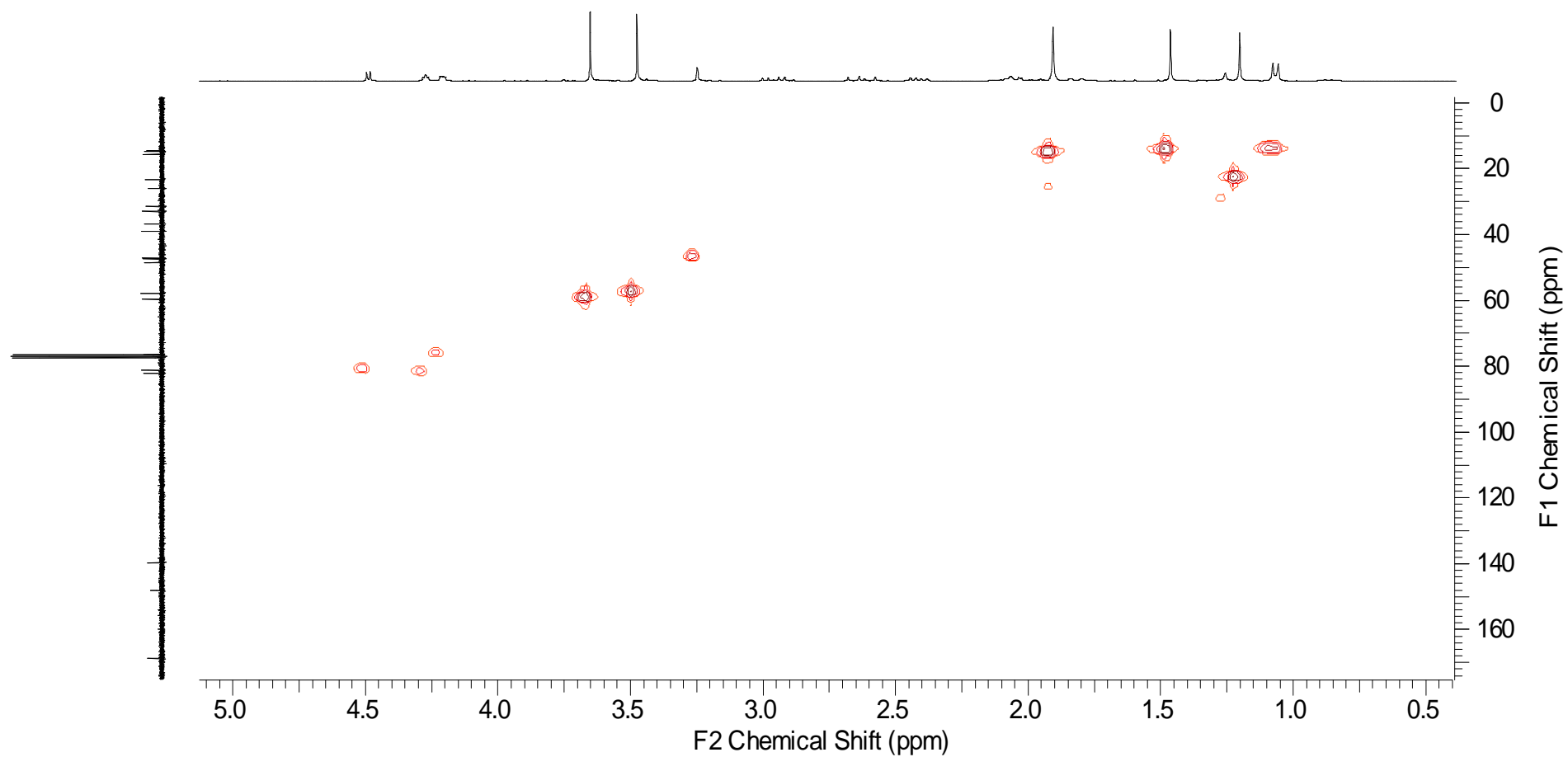
RMN ^{13}C (75,4 MHz, CDCl_3) δ ppm 206,4 (C1), 191,0 (C11), 168,8 (C16), 148,2 (C12), 139,7 (C13), 82,1 (C7), 81,3 (C2), 76,4 (C3), 59,6 ($\text{CH}_3\text{O-C12}$), 57,8 ($\text{CH}_3\text{O-C2}$), 48,5 (C10), 47,5 (C9), 47,2 (C14), 39,0 (C5), 36,8 (C8), 33,0 (C4), 31,5 (C15), 26,0 (C6), 23,2 (Me20), 15,6 (Me21), 14,7 (Me19), 14,6 (Me18).



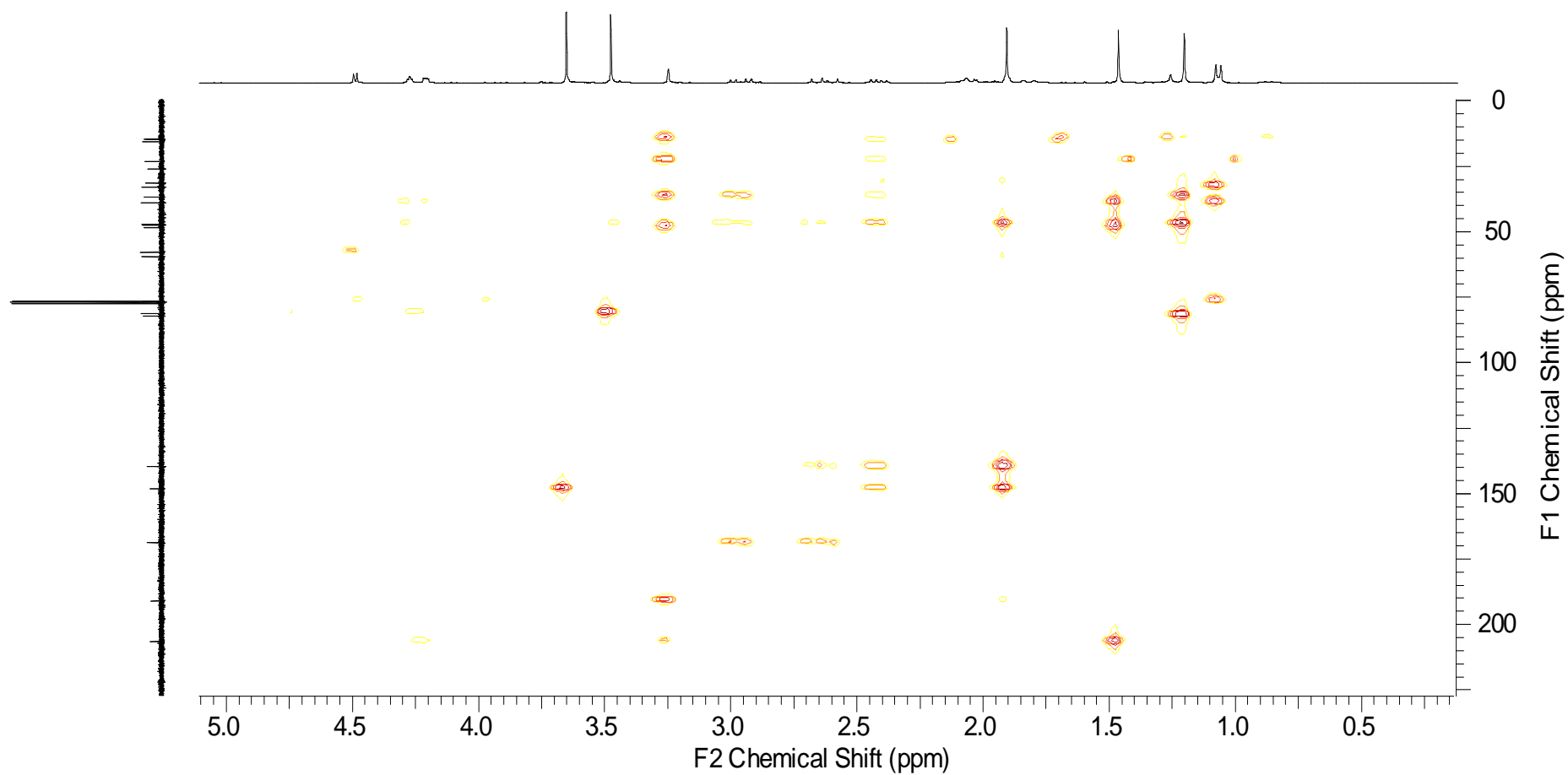
Spectres de RMN ^1H de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2-O-methylpicrasine B) dans le CDCl_3



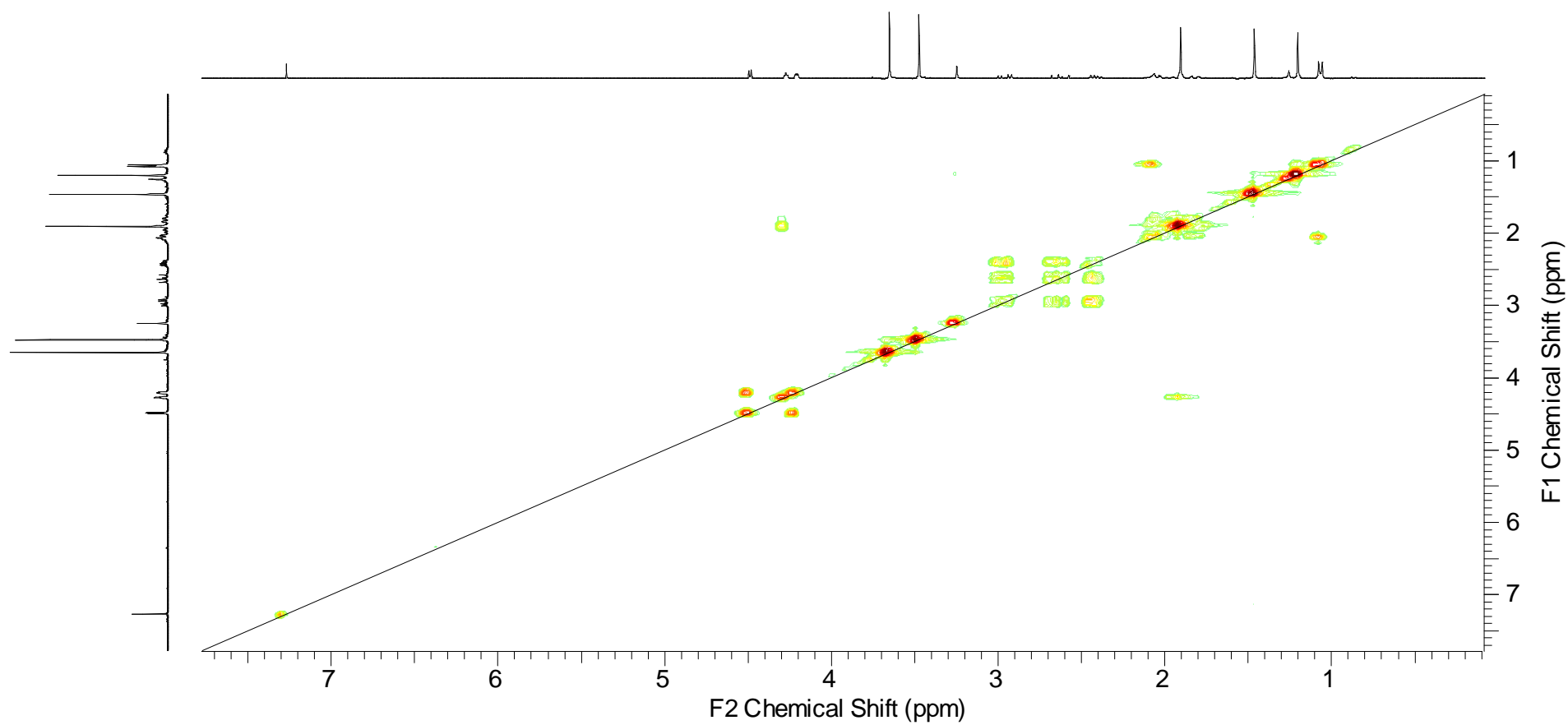
Spectre de RMN ^{13}C de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2-O-methylpicrasine B) dans le CDCl_3



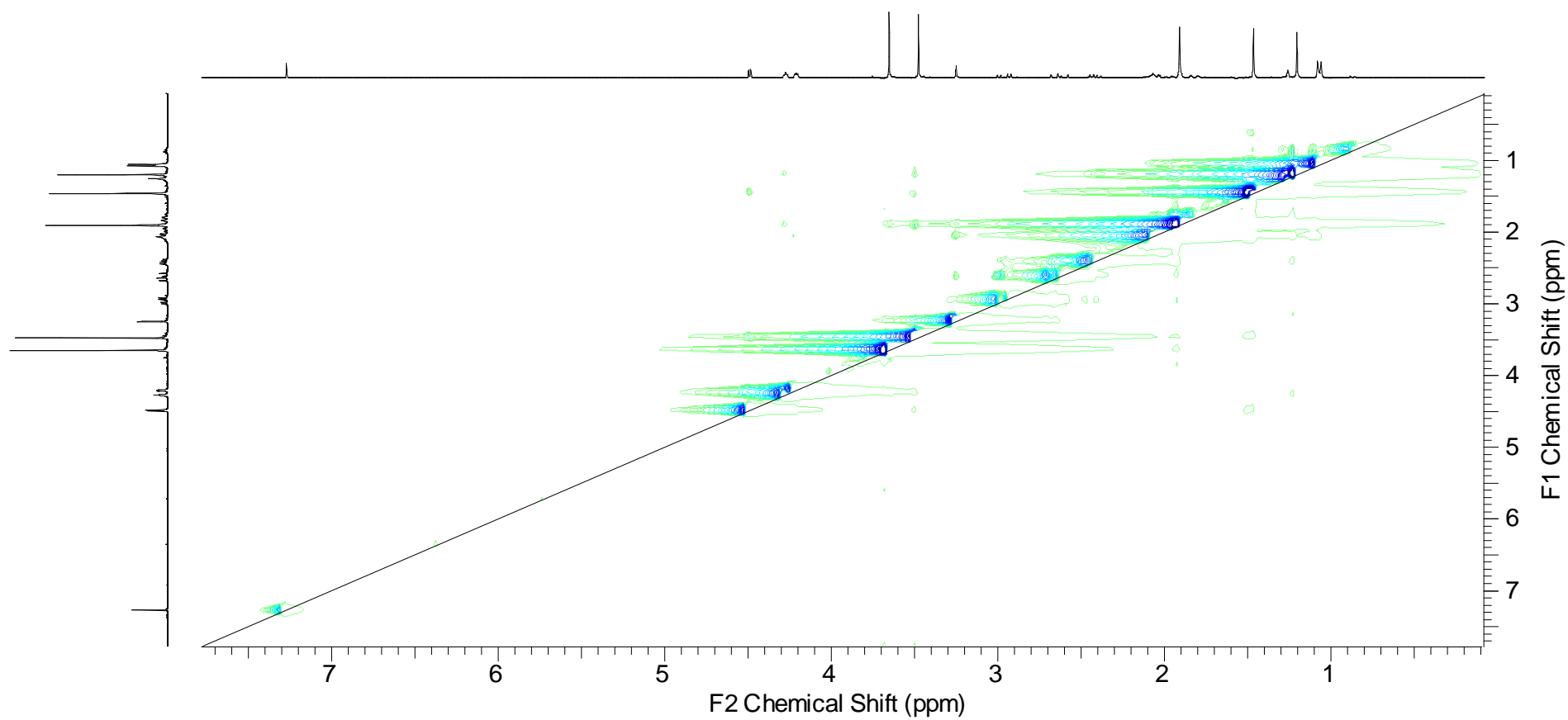
Spectre de RMN HMQC de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2-O-methylpicrasine B) dans le CDCl_3



Spectre de RMN HMBC de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2-O-methylpicrasine B) dans le CDCl_3

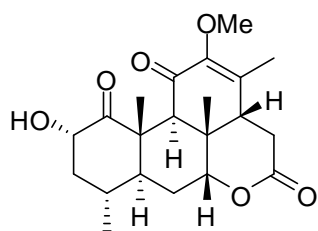


Spectre de RMN COSY de la picrasine J (3S-3-hydroxy-2-O-methylpicrasine B) dans le CDCl₃



Spectre de RMN NOESY de la picrasine J (3*S*-3-hydroxy-2-*O*-methylnpicrasine B) dans le CDCl₃

Annexe 3 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et ^{13}C (Jmod) de la picrasine B dans le CD_3CN



$\text{C}_{21}\text{H}_{28}\text{O}_6$

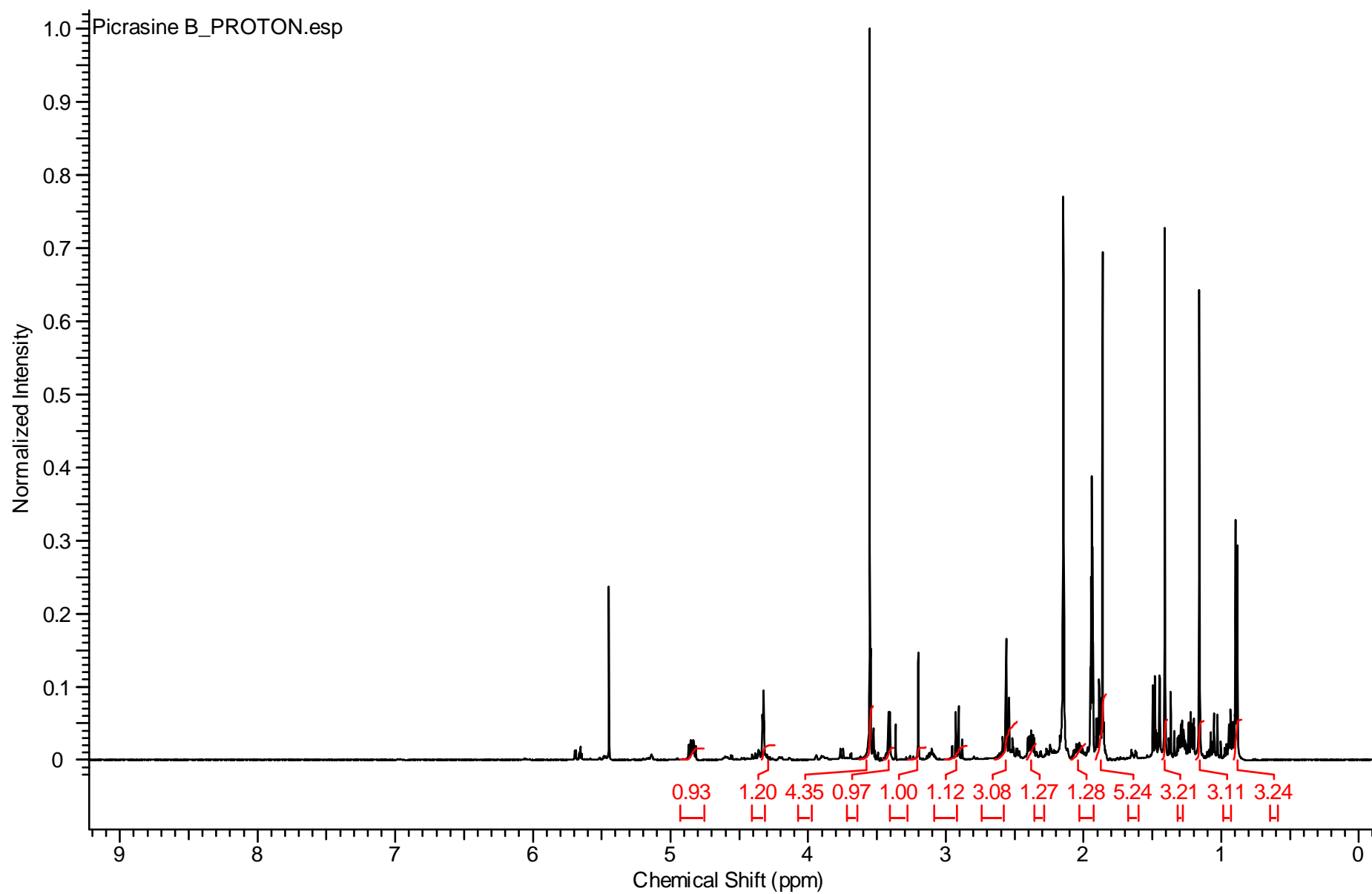
$M = 376,44$

Temps de rétention : $T_r = 8,7$ min (Supelco Discovery® C18, 15 cm x 21,2 mm, 5 μm , gradient eau-acétonitrile 70:30 à 50:50 en 10 min, puis 50:50 à 0:100 en 5 min, débit 1 ml/min).

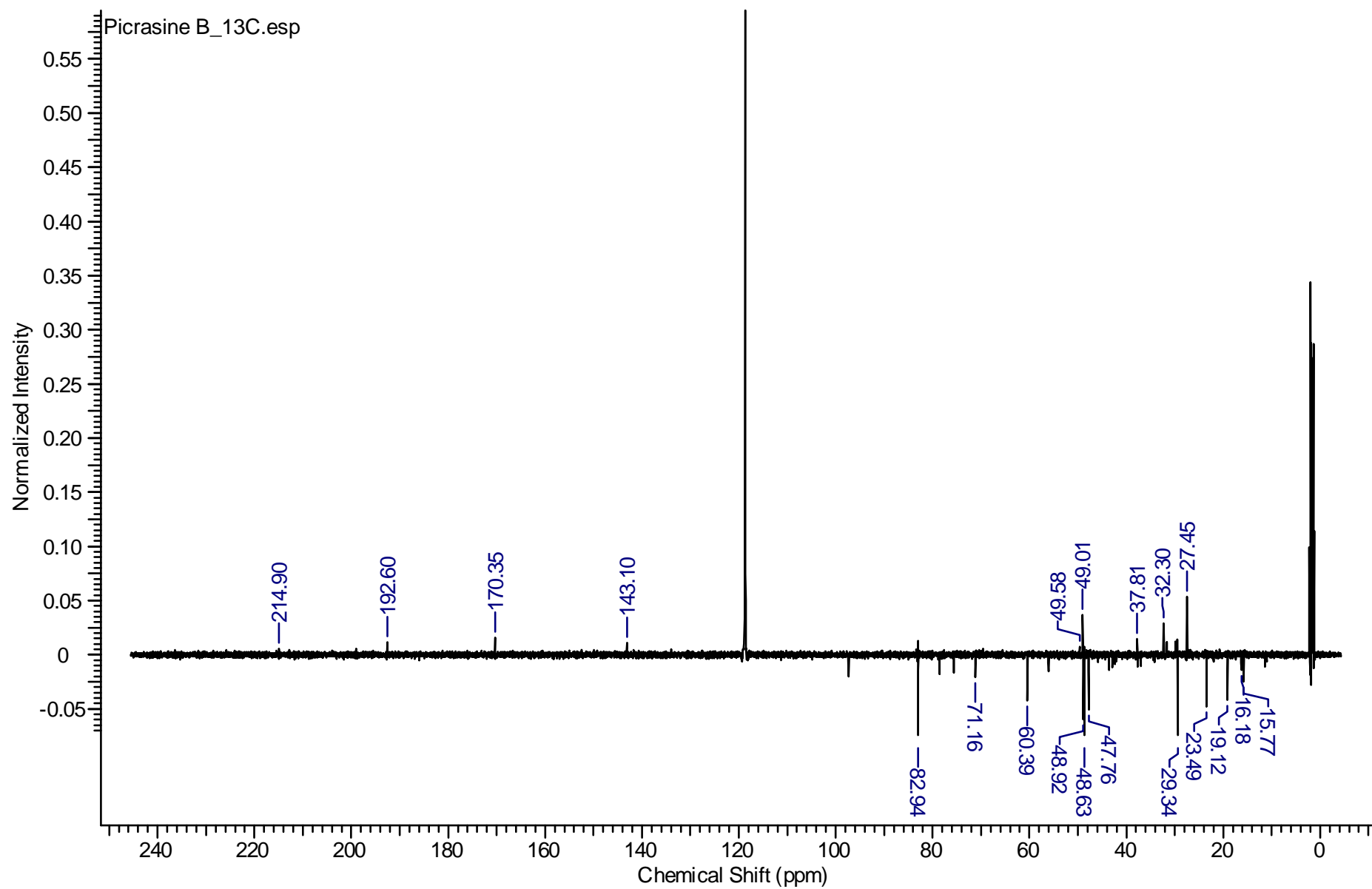
UV, λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) : 253,5 nm

RMN ^1H (500 MHz, CD_3CN) δ ppm 4,84 (1H, ddd, $J = 11,5 ; 7,4 ; 6,2$ Hz, H2), 4,32 (1H, t, $J = 2,9$ Hz, H7), 3,55 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-\text{C12}$), 3,41 (1H, d, $J = 6,1$ Hz, $\text{HO}-\text{C2}$), 3,20 (1H, s, H9), 2,92 (résonance X d'un spectre ABX, 1H, $|J_{\text{AX}} + J_{\text{BX}}| = 11,5$ Hz, $J_{\text{AX}} = -12,2$ Hz, $J_{\text{BX}} = 0,6$ Hz, H15), 2,56 (résonance AB d'un spectre ABX, 2H, $J_{\text{AB}} = 11,9$ Hz, $J_{\text{AX}} = -12,2$ Hz, $J_{\text{BX}} = 0,6$ Hz, $\nu_{\text{A}} = 1281,28$ Hz, $\nu_{\text{B}} = 1268,16$ Hz, H14 [B] + H15 [A]), 2,38 (1H, ddd, $J = 12,6 ; 7,5 ; 4,0$ Hz, H3), 2,04 (1H, m, H4), 1,89 (2H, m, H6), 1,86 (3H, s, Me21), 1,41 (3H, s, H19), 1,28 (1H, m, H5), 1,16 (3H, s, Me20), 1,06 (1H, s, H3), 0,89 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, Me18).

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CD_3CN) δ ppm 214,4 (C1), 192,1 (C11), 179,9 (C16), 148,8 (C12), 142,6 (C13), 82,5 (C7), 70,7 (C2), 59,9 ($\text{CH}_3\text{O}-\text{C12}$), 49,2 (C10), 48,5 (C3), 48,4 (C5), 48,2 (C9), 47,3 (C14), 37,4 (C8), 31,8 (C15), 28,9 (C4), 27,0 (C6), 23,0 (Me20), 18,7 (Me18), 15,8 (Me21), 15,3 (Me19).

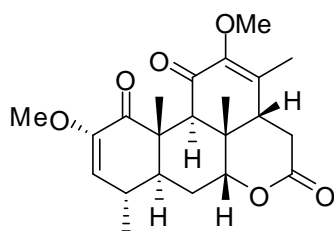


Spectre de RMN ^1H de la picrasine B dans le CD_3CN



Spectres de RMN ^{13}C (Jmod) de la picrasine B dans le CD_3CN

Annexe 4 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et ^{13}C (Jmod) de la picrasine H (2-O-methylpicrasine B) dans le CD_3CN



$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_6$

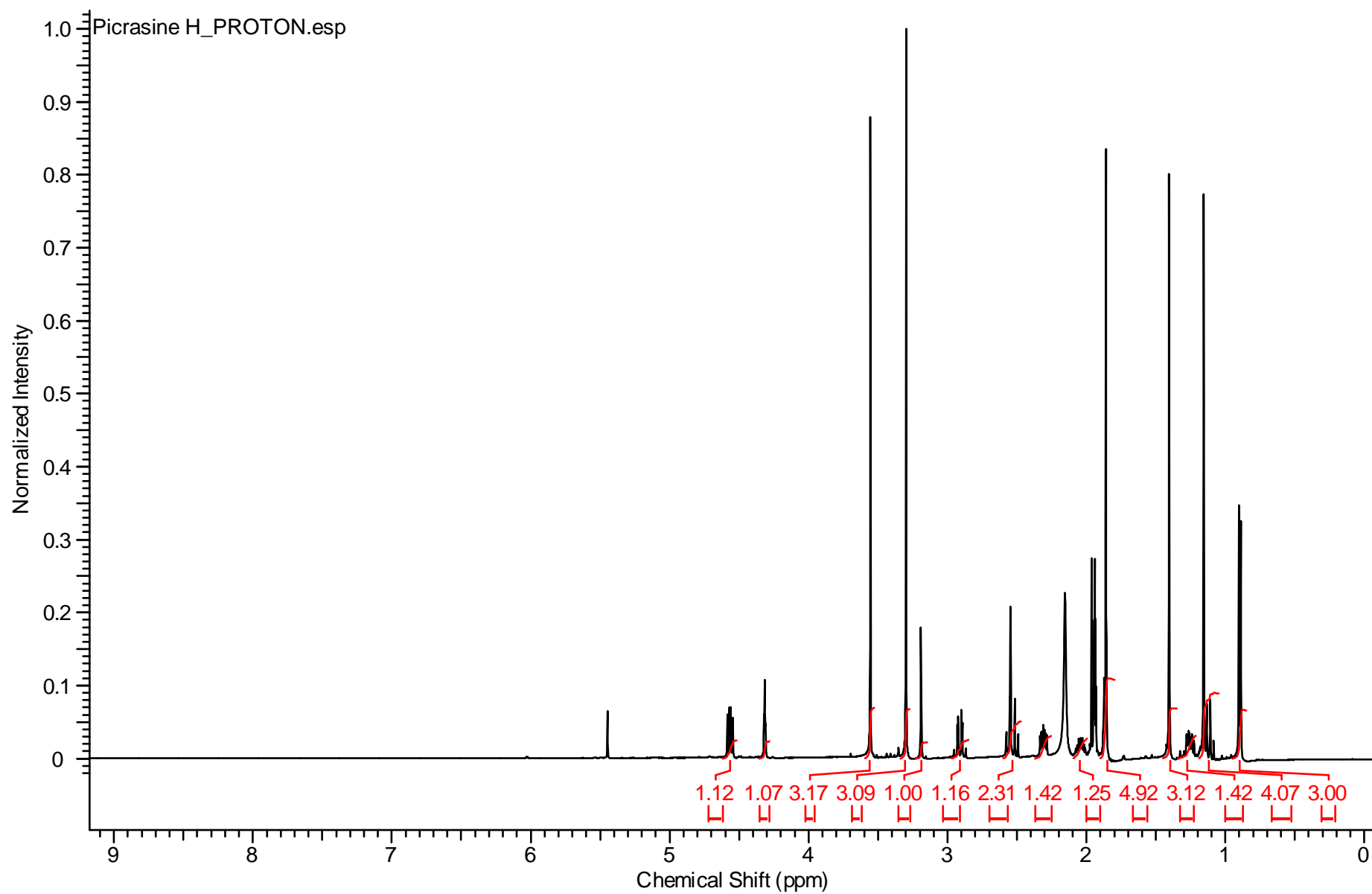
$M = 390,47$

Temps de rétention : $T_r = 10,5$ min (Supelco Discovery® C18, 15 cm x 21,2 mm, 5 μm , gradient eau-acétonitrile 70:30 à 50:50 en 10 min, puis 50:50 à 0:100 en 5 min, débit 1 ml/min).

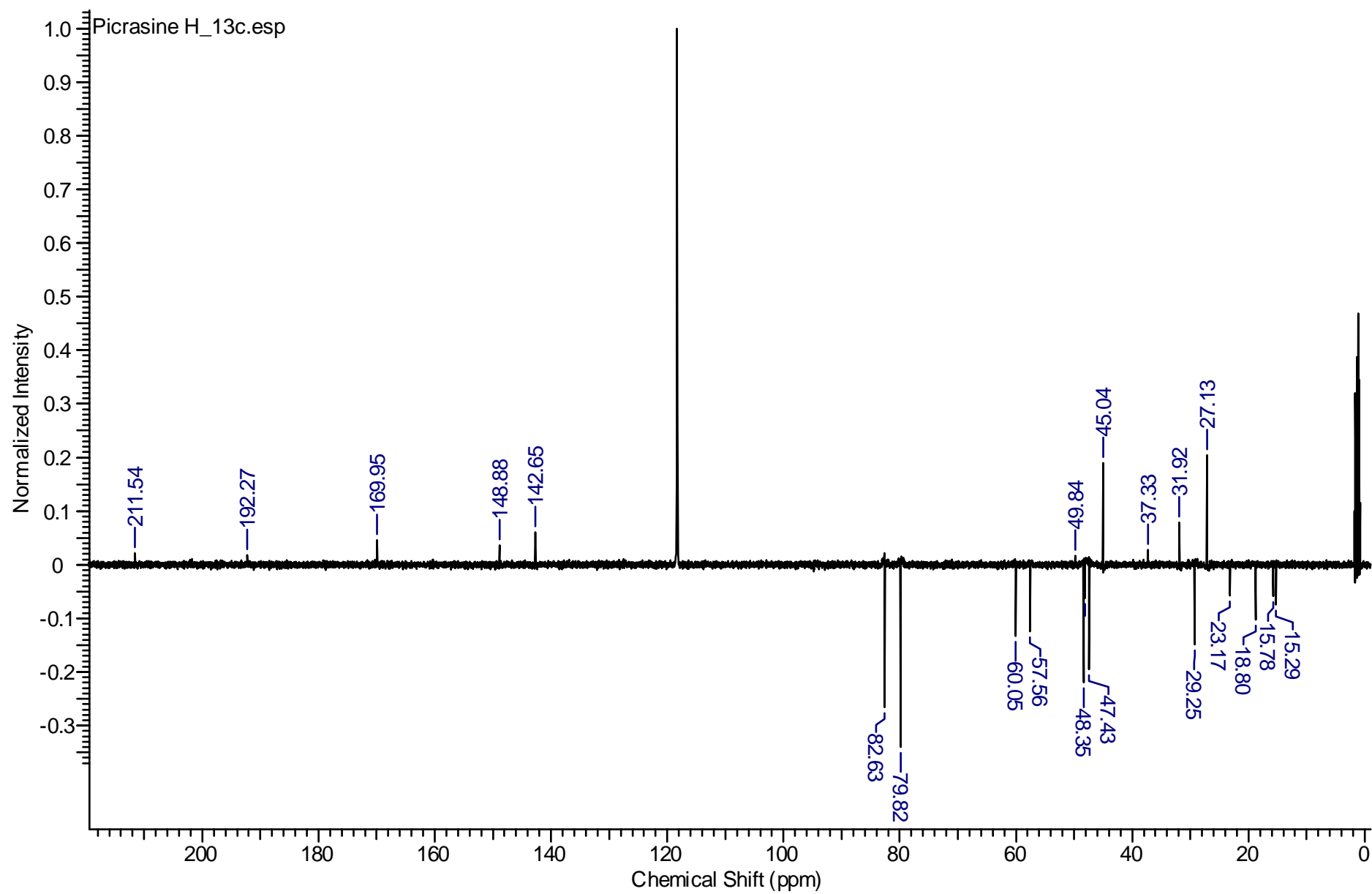
UV, λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) : 252,30 nm

RMN ^1H (500 MHz, CD_3CN) δ ppm 4,55 (1H, dd, $J = 11,9$; 7,1 Hz, H_{2ax}), 4,30 (1H, t, $J = 2,8$ Hz, H_{7eq}), 3,54 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_{12}$), 3,29 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_2$), 3,18 (1H, s, H_9), 2,90 (résonance X d'un spectre ABX, 1H, $|J_{AX} + J_{BX}| = 11,7$ Hz, $J_{AX} = -17,9$ Hz, $J_{BX} = 6,2$ Hz, H_{15}), 2,53 (1H, m, H_{14}), 2,53 (résonance AB d'un spectre ABX, 2H, $J_{AB} = 11,9$ Hz, $J_{AX} = -17,9$ Hz, $J_{BX} = 6,2$ Hz, $\nu_A = 1249,98$ Hz, $\nu_B = 1265,3$ Hz, H_{14eq} [B] + H_{15} [A]), 2,30 (1H, ddd, $J = 12,5$; 7,0 ; 4,0 Hz, H_{3eq}), 2,03 (1H, m, H_{4ax}), 1,86 (2H, m, H_6), 1,87 (3H, s, Me21), 1,40 (3H, s, Me19), 1,25 (1H, m, H_5), 1,15 (3H, s, H_{20}), 1,11 (1H, q, $J = 12,3$ Hz, H_{3ax}), 0,88 (3H, d, $J = 6,5$ Hz, Me18).

RMN ^{13}C (125,8 MHz, CD_3CN) δ ppm 211,1 (C_1), 192,3 (C_{11}), 170,0 (C_{16}), 148,9 (C_{12}), 124,6 (C_{13}), 82,6 (C_7), 79,8 (C_2), 60,0 ($\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_{12}$), 57,6 ($\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_2$), 49,8 (C_{10}), 48,3 (C_5), 48,0 (C_9), 47,4 (C_{14}), 45,3 (C_3), 37,3 (C_8), 31,9 (C_{15}), 29,2 (C_4), 27,1 (C_6), 23,2 (Me20), 18,8 (Me18), 17,8 (Me21), 15,3 (Me19).

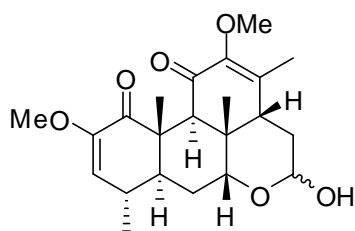


Spectre de RMN ^1H de la picrasine H (2-O-methylpicrasine B) dans le CD_3CN



Spectre de RMN ^{13}C (Jmod) de la picrasine H (2-O-methylpicrasine B) dans le CD_3CN

Annexe 5 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et ^{13}C de la néoquassine et isomère (60 : 40) dans le CDCl_3



$\text{C}_{22}\text{H}_{30}\text{O}_6$

$M = 390,47$

Temps de rétention : $\text{Tr} = 11,1$ min (Supelco Discovery® C18, 15 cm x 21,2 mm, 5 μm , gradient eau-acétonitrile 70:30 à 50:50 en 10 min, puis 50:50 à 0:100 en 5 min, débit 1 ml/min).

UV, λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) : 253,30 nm

Isomère majoritaire:

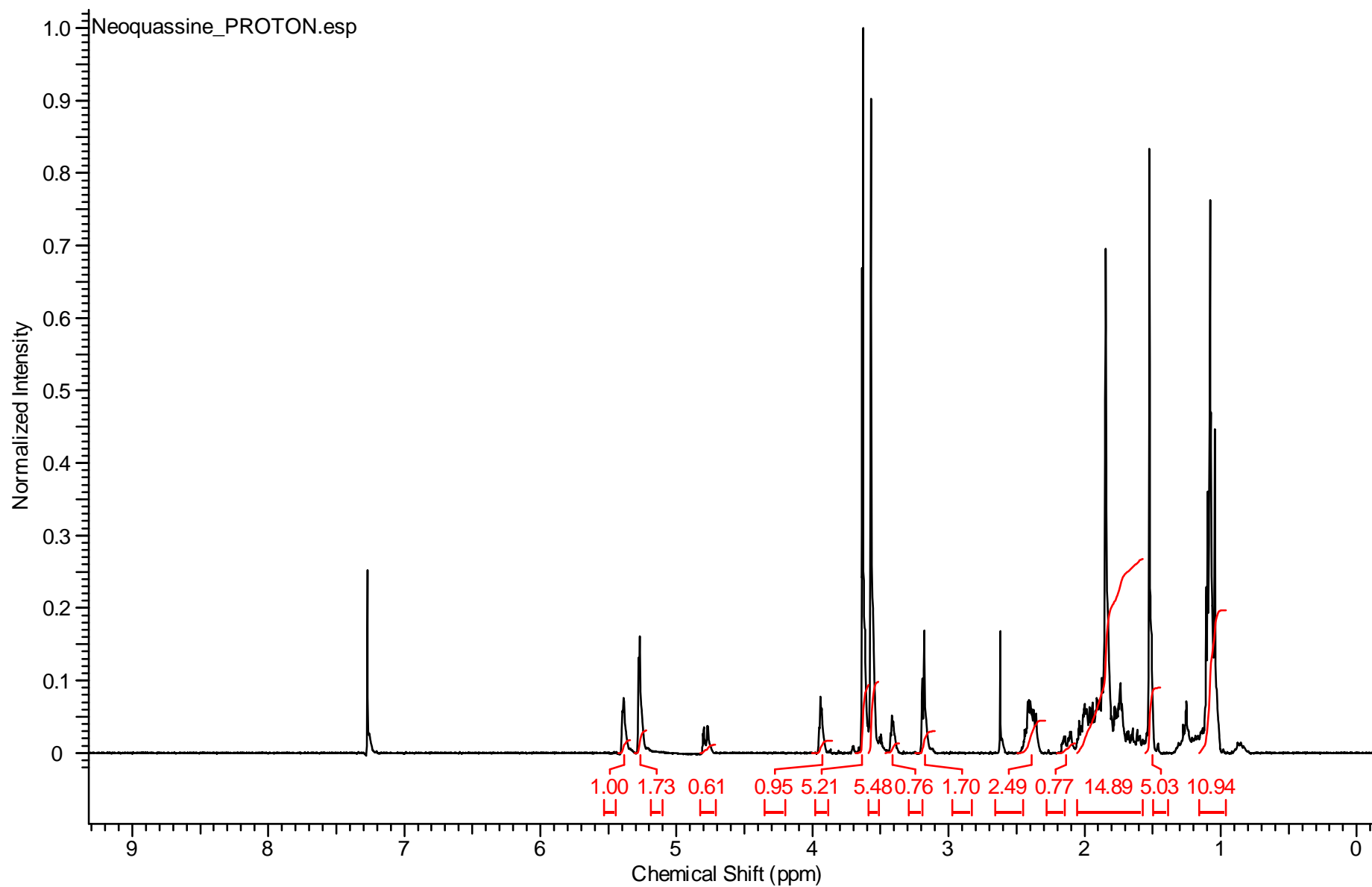
RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 5,40 (1H, d, $J = 2,5$ Hz, $\text{H}_{16\text{eq}}$), 5,27 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H3), 3,94 (1H, t, $J = 2,9$ Hz, H7), 3,63 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_{12}$), 3,57 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_2$), 3,17 (1H, s, H9), 2,41 (1H, m, H4), 2,38 (1H, dd, $J = 12,5$; 4,8 Hz, H14), 1,84 (3H, s, Me21), 1,54 – 2,07 (6H, m, H5, $\text{H}_{6\text{a}}$, $\text{H}_{6\text{b}}$, $\text{H}_{15\text{a}}$, $\text{H}_{15\text{b}}$, $\text{HO}-\text{C}_{16}$), 1,52 (3H, s, Me19), 1,08 (3H, d, $J = 6,9$ Hz, Me18), 1,08 (3H, s, Me20).

RMN ^{13}C (75,4 MHz, CDCl_3) δ ppm 198,9 (C1), 192,9 (C11), 148,3 (C12), 148,1 (C2), 139,5 (C13), 116,2 (C3), 91,0 (C16), 69,3 (C7), 59,1 ($\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_{12}$), 54,9 ($\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_2$), 46,2 (C10), 45,8 (C9), 43,8 (C5), 43,3 (C14), 38,5 (C8), 31,3 (C15), 25,7 (C6), 22,1 (Me20), 19,5 (Me18), 15,3 (Me21), 12,8 (Me19).

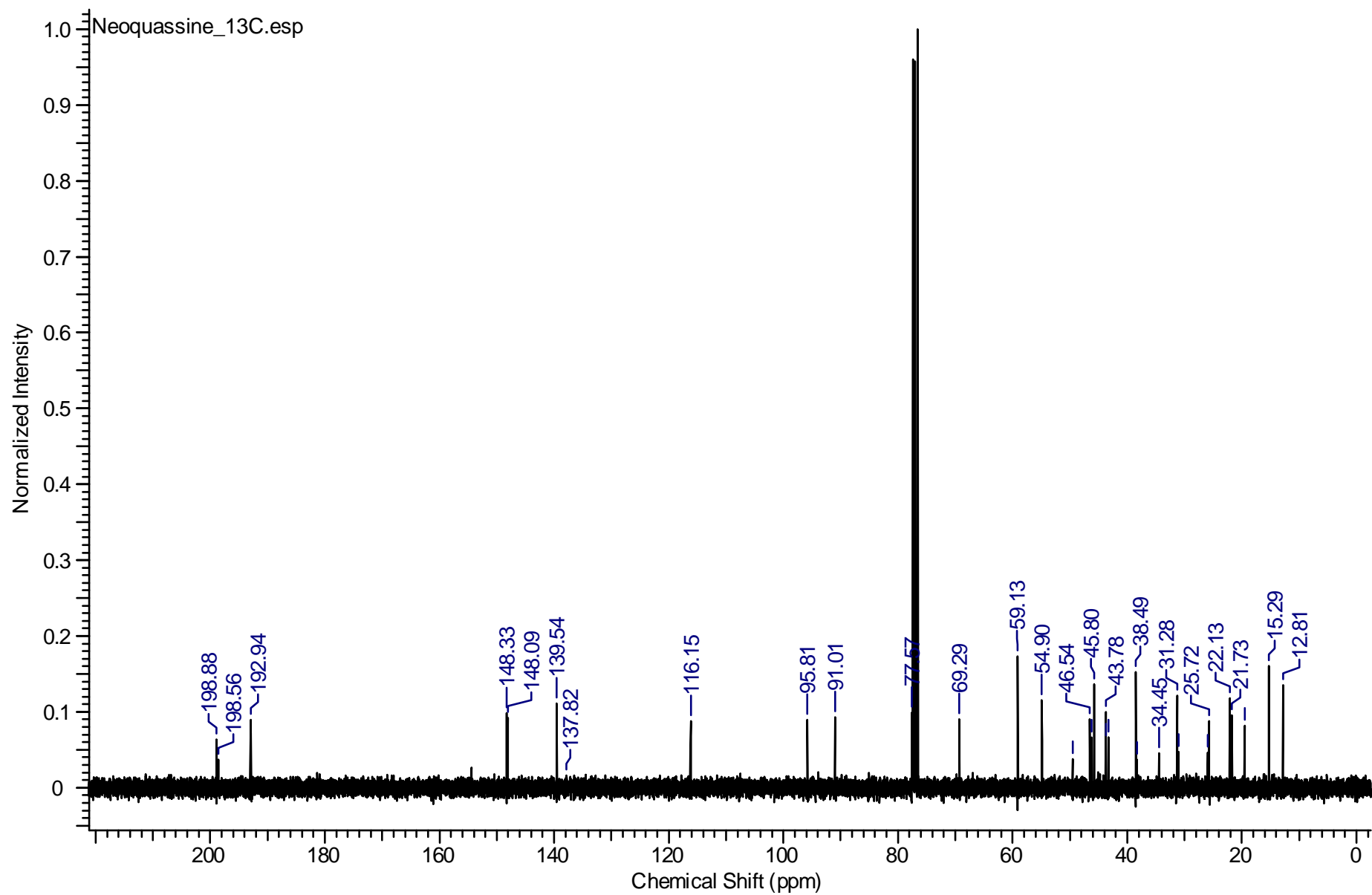
Isomère minoritaire:

RMN ^1H (300 MHz, CDCl_3) δ ppm 5,27 (1H, d, $J = 2,4$ Hz, H3), 4,78 (1H, dd, $J = 9,6$; 2,1 Hz, $\text{H}_{16\text{ax}}$), 3,64 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_{12}$), 3,57 (3H, s, $\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_2$), 3,41 (1H, t, $J = 2,9$ Hz, H7), 3,18 (1H, s, H9), 2,41 (1H, m, H4), 1,84 (3H, s, Me21), 2,14 (1H, ddd, $J = 13,0$; 4,4 ; 2,1 Hz, $\text{H}_{15\text{eq}}$), 1,54 – 2,07 (6H, m, H5, $\text{H}_{6\text{a}}$, $\text{H}_{6\text{b}}$, $\text{H}_{14\text{a}}$, $\text{H}_{15\text{ax}}$, $\text{HO}-\text{C}_{16}$), 1,53 (3H, s, Me19), 1,09 (3H, d, $J = 7,0$ Hz, Me18), 1,04 (3H, s, Me20).

RMN ^{13}C (75,4 MHz, CDCl_3) δ ppm 198,5 (C1), 192,9 (C11), 148,3 (C12), 148,1 (C2), 137,8 (C13), 116,1 (C3), 95,8 (C16), 77,6 (C7), 59,1 ($\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_{12}$), 54,8 ($\text{CH}_3\text{O}-\text{C}_2$), 46,6 (C10), 46,5 (C9), 46,2 (C10), 43,7 (C5), 38,3 (C8), 34,5 (C15), 31,3 (C4), 25,9 (C6), 21,7 (Me20), 19,5 (Me18), 15,2 (Me21), 12,9 (Me19).

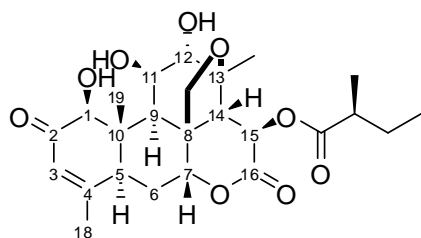


Spectre de RMN ^1H de la néoquassine et isomère (60 : 40) dans le CDCl_3



Spectre de RMN ^{13}C de la néoquassine et isomère (60 : 40) dans le CDCl_3

Annexe 6 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et HMQC de la simalikalactone D dans le CD_3CN



$\text{C}_{24}\text{H}_{34}\text{O}_9$

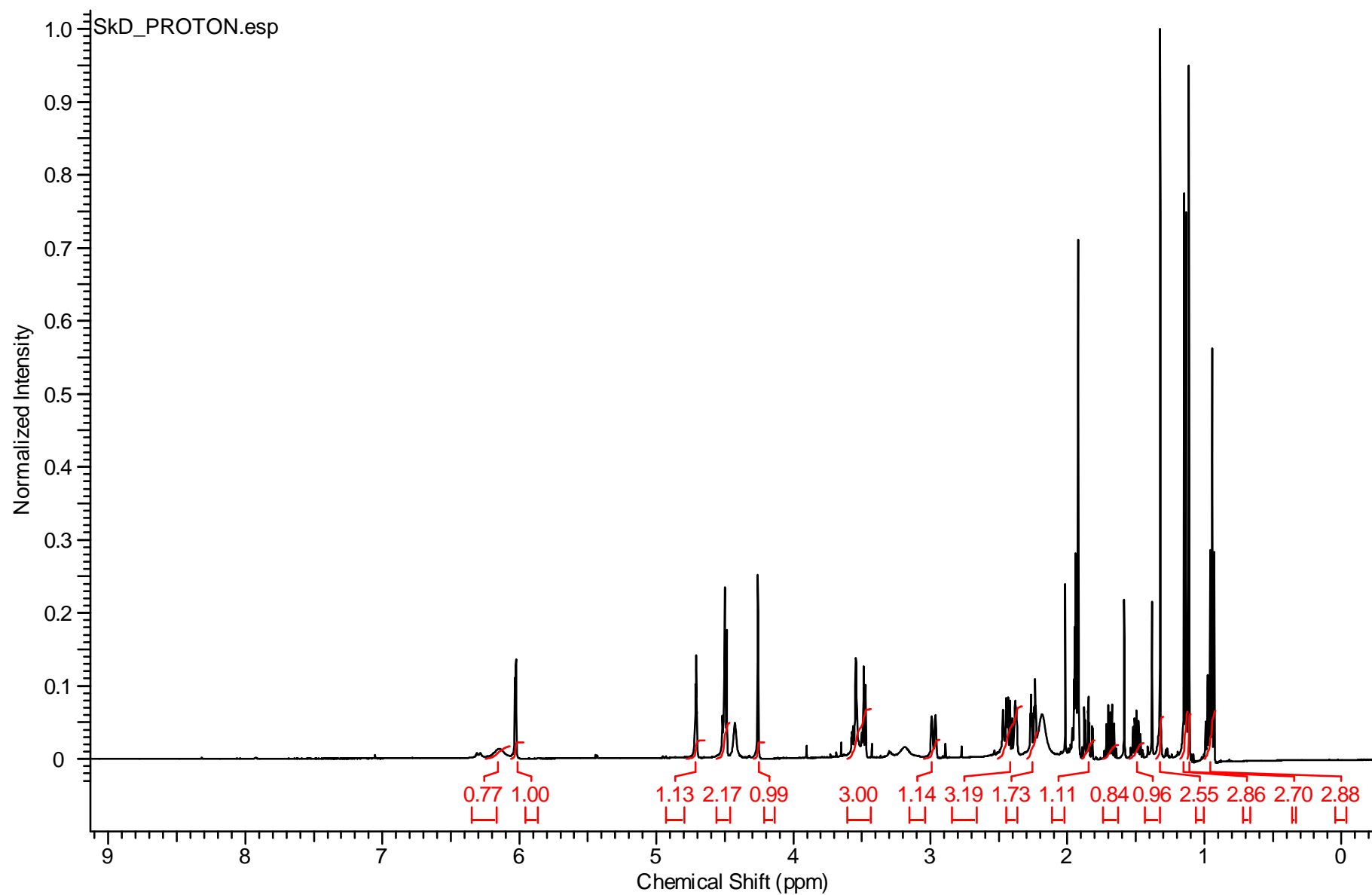
$M = 478,54$

Temps de rétention : $\text{Tr} = 12,0$ min (Supelco Discovery® C18, 15 cm x 21,2 mm, 5 μm , gradient eau-acétonitrile 70:30 à 50:50 en 10 min, puis 50:50 à 0:100 en 5 min, débit 1 ml/min).

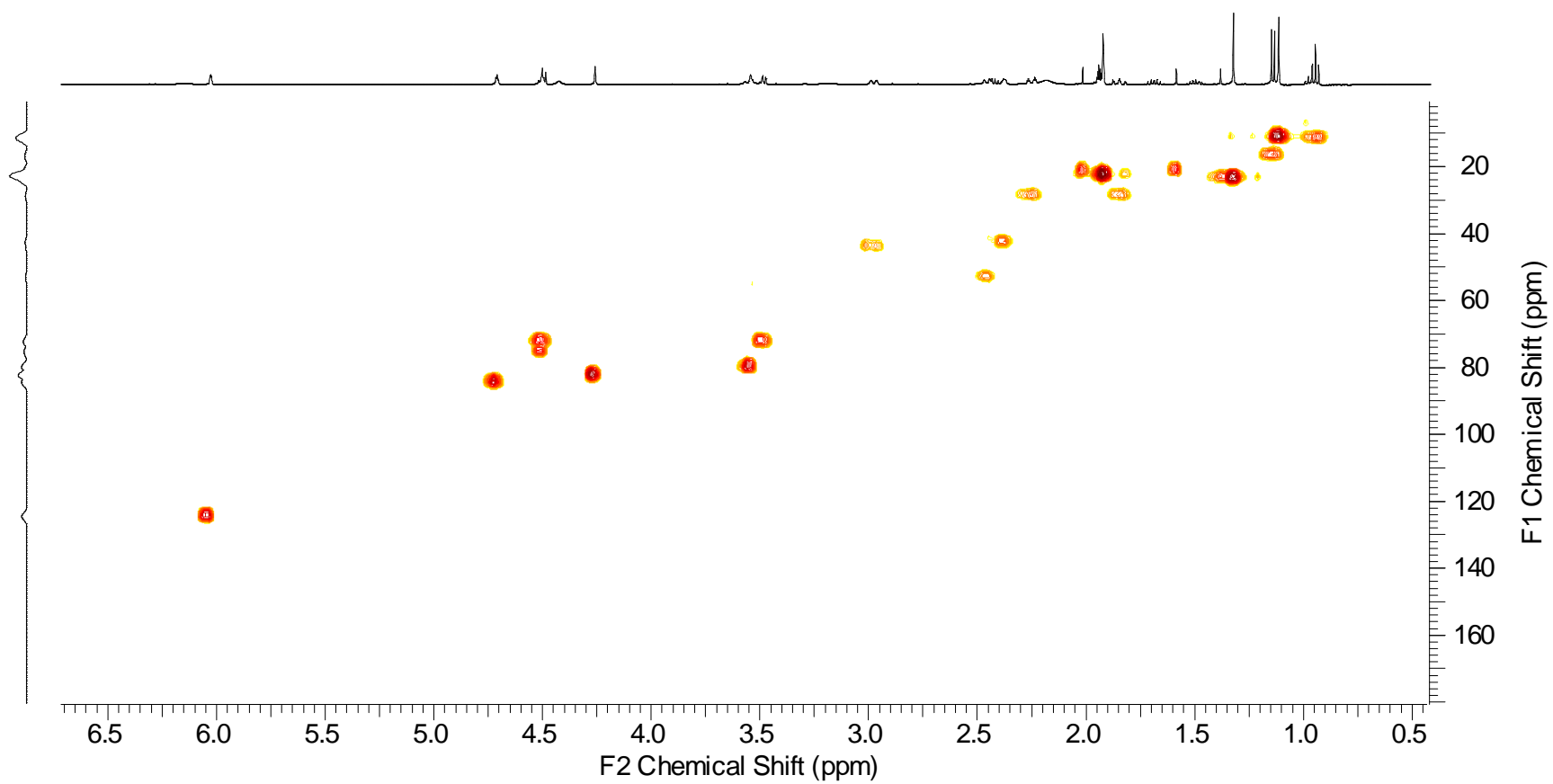
UV, λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) : 244.,00 nm

RMN ^1H (500 MHz, CD_3CN) δ ppm 6,14 (1H, brd, $J = 12,8$ Hz, H15), 6,02 (1H, m, H3), 4,71 (1H, t, $J = 2,6$ Hz, H7), 4,50 (1H, m, H11), 4,49 (1H, d, $J = 7,8$ Hz, H20), 4,26 (1H, s, H1), 3,54 (1H, brs, H12), 3,48 (1H, dd, $J = 7,7$; 1,6 Hz, H20), 2,97 (1H, brd, $J = 13,0$ Hz, H5), 2,45 (1H, brd, $J = 12,8$ Hz, H14), 2,41 (1H, m, H2'), 2,37 (1H, brd, $J = 3,4$ Hz, H9), 2,25 (1H, brdt, 1H, $J = 15,3$; 2,6 Hz, H6 $_{eq}$), 2,18 (brs, 3H, OH), 1,92 (3H, t, $J = 1,2$ Hz, Me18), 1,82 (1H, ddd, $J = 15,3$; 13,0 ; 2,6 Hz, H6 $_{ax}$), 1,67 (1H, dq, $J = 13,6$; 7,7 Hz H3'), 1,48 (1H, dqd, $J = 13,6$; 7,7 ; 6,2 Hz, H3'), 1,30 (3H, s, H21), 1,13 (3H, d, $J = 6,9$ Hz, H5'), 1,10 (3H, s, H19), 0,93 (2H, dd, $J = 3,7$, 3,7 Hz, H4').

RMN ^{13}C (100,6 MHz, CD_3CN) δ ppm 199,0 (C2), 175,6 (C1'), 169,0 (C16), 165,5 (C4), 124,5 (C3), 84,4 (C7), 82,3 (C1), 81,2 (C13), 80,0 (C12), 75,3 (C11), 72,4 (C20), 68,7 (C15), 53,0 (C14), 48,8 (C10), 46,7 (C8), 44,1 (C5), 42,8 (C9), 41,8 (C2'), 28,8 (C6), 27,5 (C3'), 23,6 (C21), 22,7 (C18), 16,9 (C5'), 11,9 (C4'), 11,4 (C19).

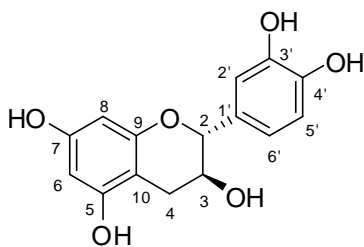


Spectre de RMN ^1H de la simalikalactone D dans le CD_3CN



Spectre de RMN HMQC de la simalikalactone D dans le CD_3CN

Annexe 7 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et gHSQCAD de la (+)-catéchine (1) dans l'acétone- d_6



$\text{C}_{15}\text{H}_{12}\text{O}_6$

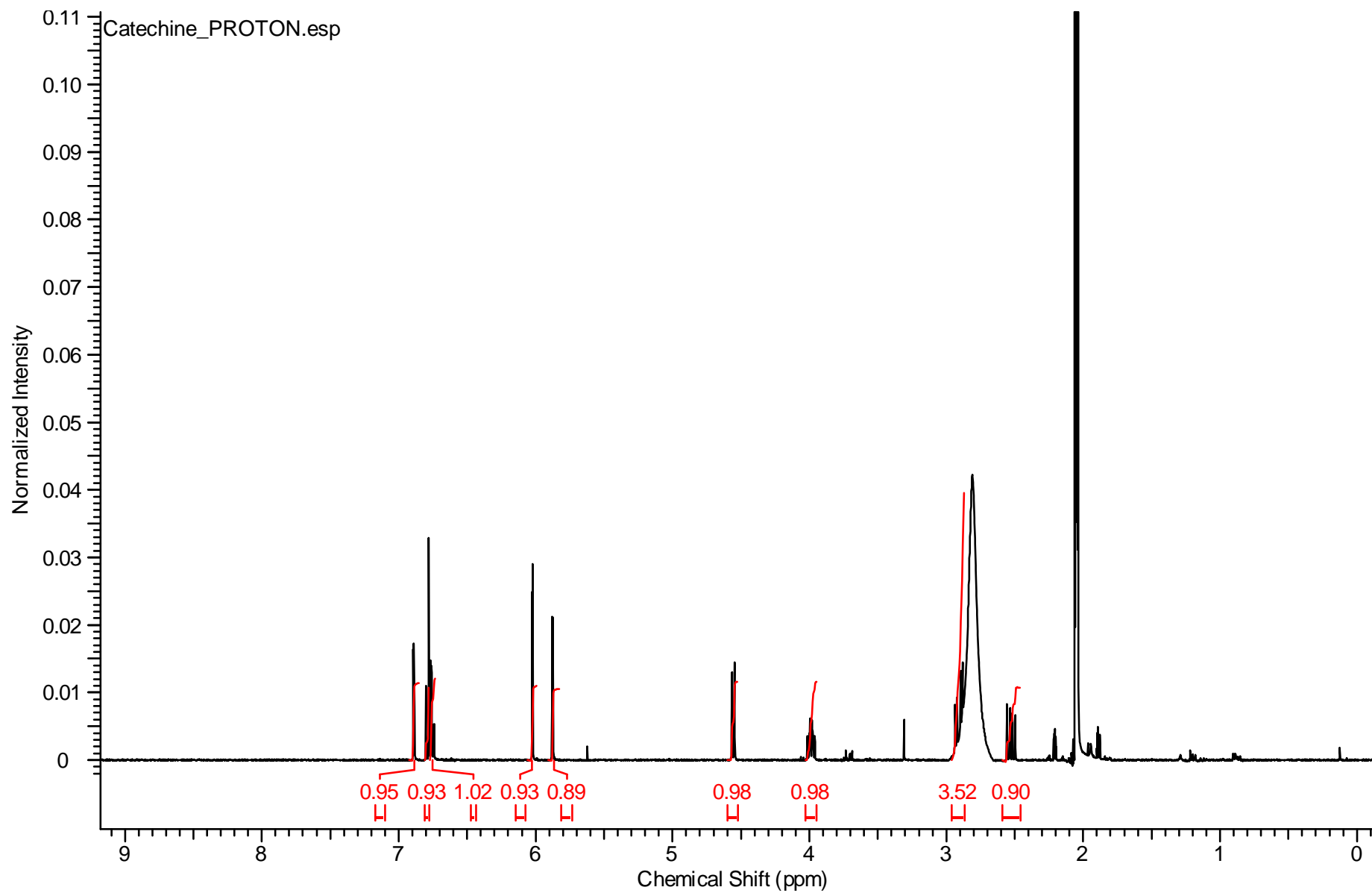
$M = 288,25$

Temps de rétention : $T_r = 12,3$ min (Supelco Discovery® C18, 15 cm x 21,2 mm, 5 μm , gradient eau-acétonitrile 90:10 à 0:100 en 30 min, débit 1 ml/min).

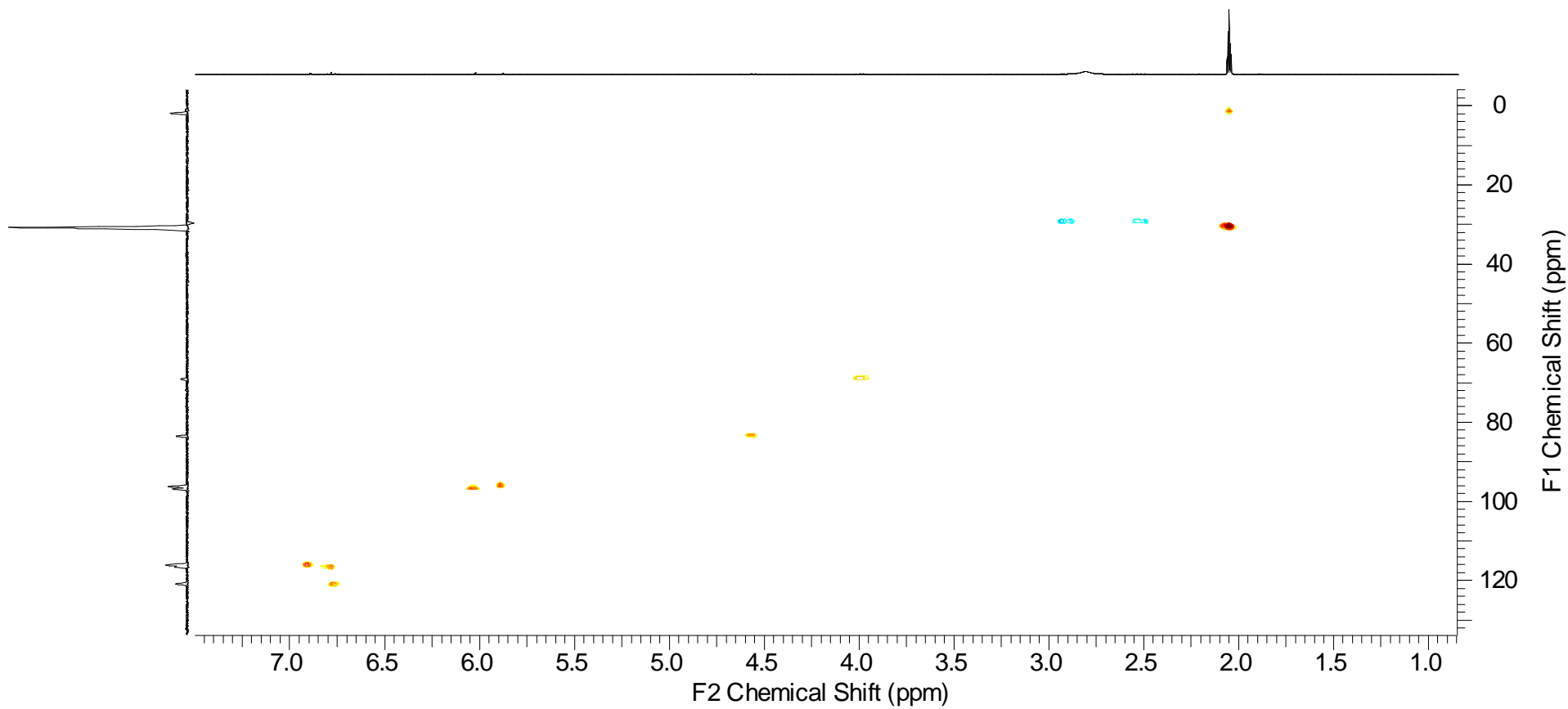
UV, λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) : 279,6 nm

RMN ^1H (400 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) δ ppm 6,89 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H2'), 6,79 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H5'), 6,75 (dd, $J = 8,2$; 2,0 Hz 1H, H6'), 6,02 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H6), 5,88 (d, $J = 2,3$ Hz, 1H, H8), 4,56 (d, $J = 7,8$ Hz, 1H, H2), 3,99 (dt, $J = 7,8$; 5,5 Hz, 1H, H3), 2,91 (dd, $J = 16,1$; 5,5 Hz, 1H, H4a), 2,53 (dd, $J = 16,1$; 8,5 Hz, 1H, H4b).

RMN ^{13}C (100,6 MHz, $\text{C}_3\text{D}_6\text{O}$) δ ppm 158,2 (C7), 157,7 (C5), 156,9 (C9), 146,3 (C3'), 146,3 (C4'), 132,9 (C1'), 120,8 (C6'), 116,5 (C5'), 116,0 (C2'), 101,3 (C10), 96,9 (C6), 96,2 (C8), 83,5 (C2), 69,1 (C3), 29,6 (C4).

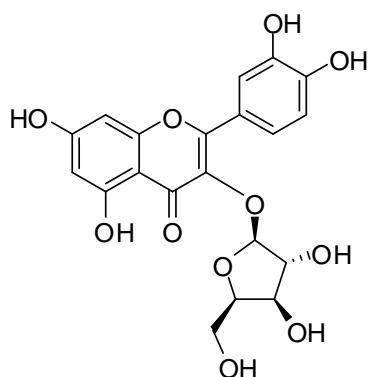


Spectre de RMN ^1H de la (+)-catéchine (1) dans l'acétone- d_6



Spectre de RMN gHSQCAD de la (+)-catéchine (1) dans l'acétone-d₆

Annexe 8 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H , gHSQCAD, gHMBCAD et COSY de la quercitrine-3-*O*- β -D-xylofuranoside (3) dans le CD_3OD



$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$

$M = 434,35$

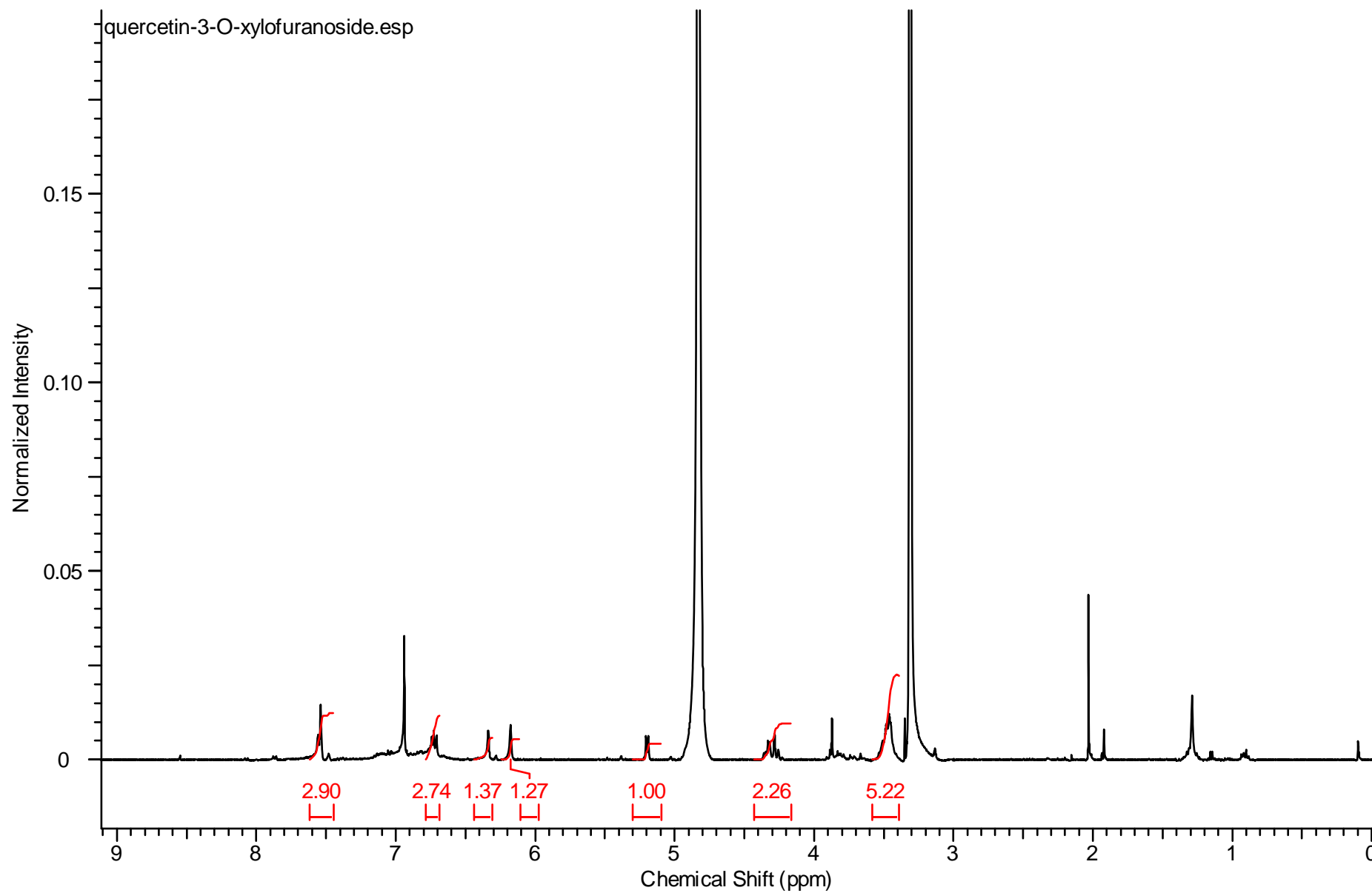
Temps de rétention : $\text{Tr} = 7,1$ min (Supelco Discovery® C18, 15 cm x 21,2 mm, 5 μm , élution eau-acétonitrile 83:17 pendant 15 min, débit 1 ml/min).

UV, λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) : 265,3 / 352,3 nm

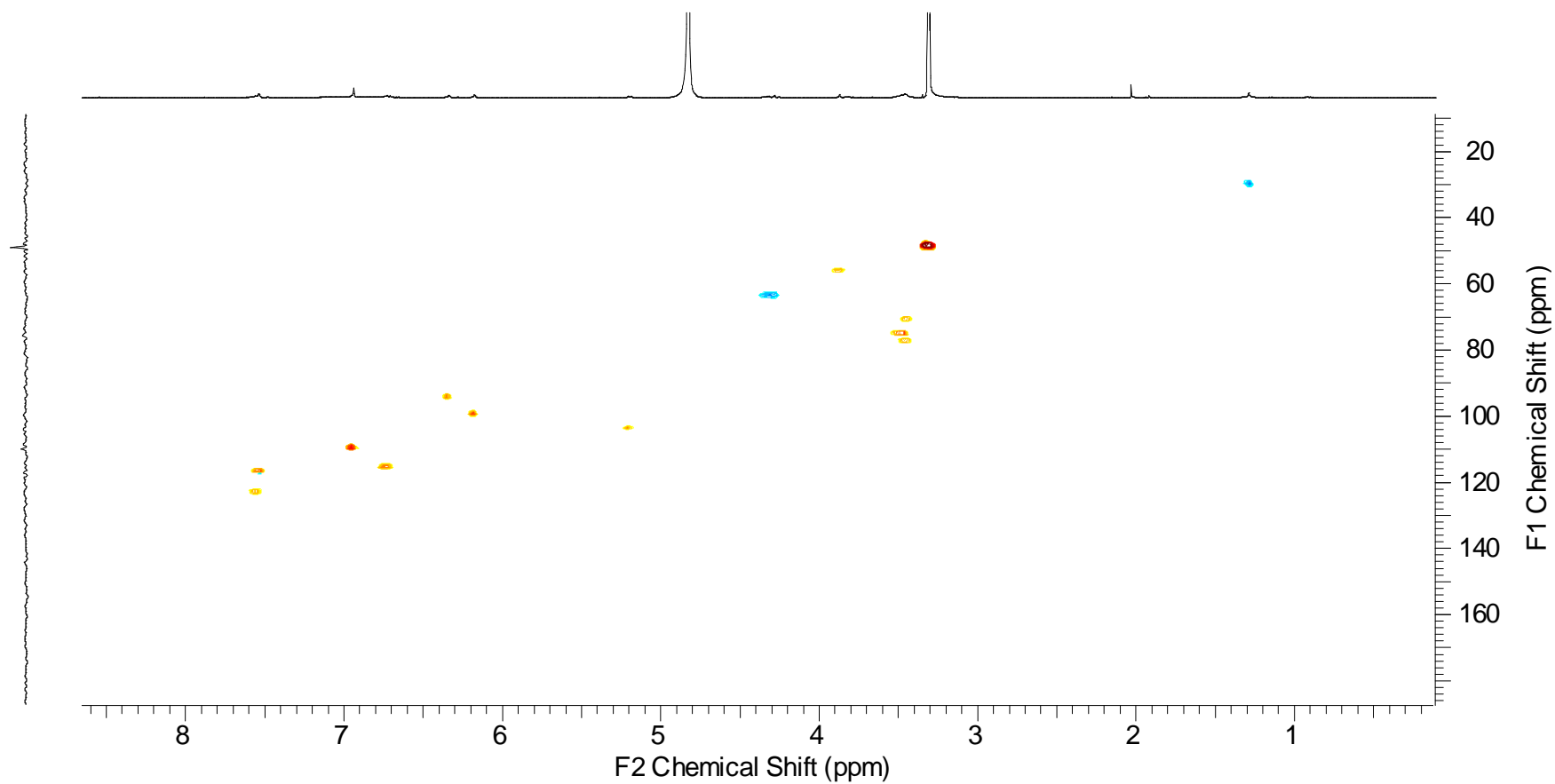
$[\alpha]_{\text{D}}^{27} = 384$ (c 0,208 ; CH_3OH)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,56 (s, 1H, H2') 7,54 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H6''), 6,73 (m, 1H, H5'), 6,34 (s, 1H, H6), 6,18 (s, 1H, H8), 5,20 (d, $J = 7,3$ Hz, 1H, H1''), 4,30 (m, 2H, H5''a, H5''b), 3,49 (m, 3H, H2'', H3'', H4'').

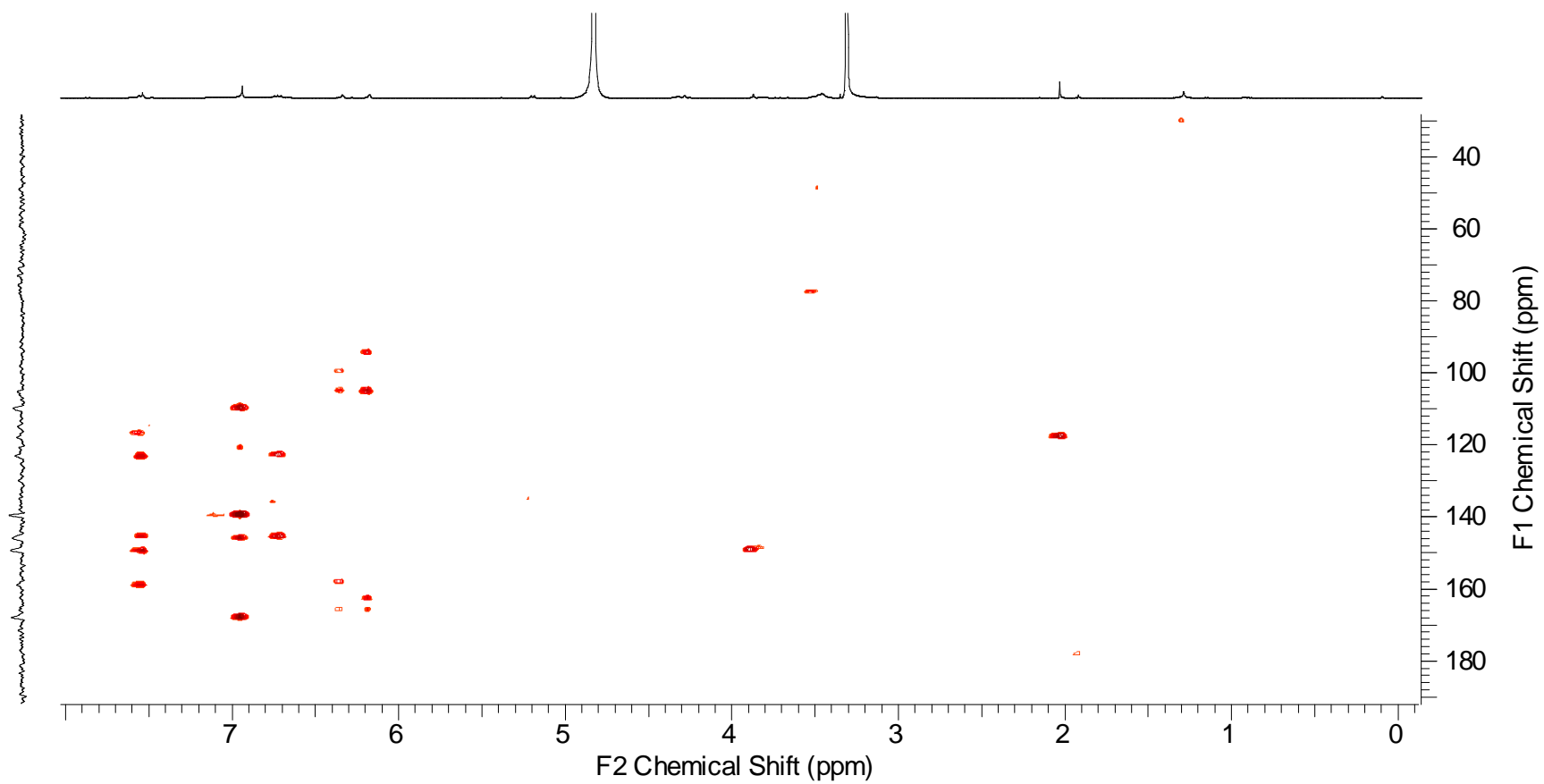
^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD) δ ppm 165,8 (C7), 162,6 (C9), 159,1 (C2), 158,0 (C5), 153,4 (C3), 149,4 (C4'), 145,5 (C3'), 123,3 (C6'), 122,7 (C1'), 117,0 (C2'), 115,8 (C5'), 105,2 (C10), 104,0 (C1''), 99,7 (C8), 94,5 (C6), 77,9 (C4''), 75,6 (C2''), 71,3 (C3''), 64,1 (C5'').



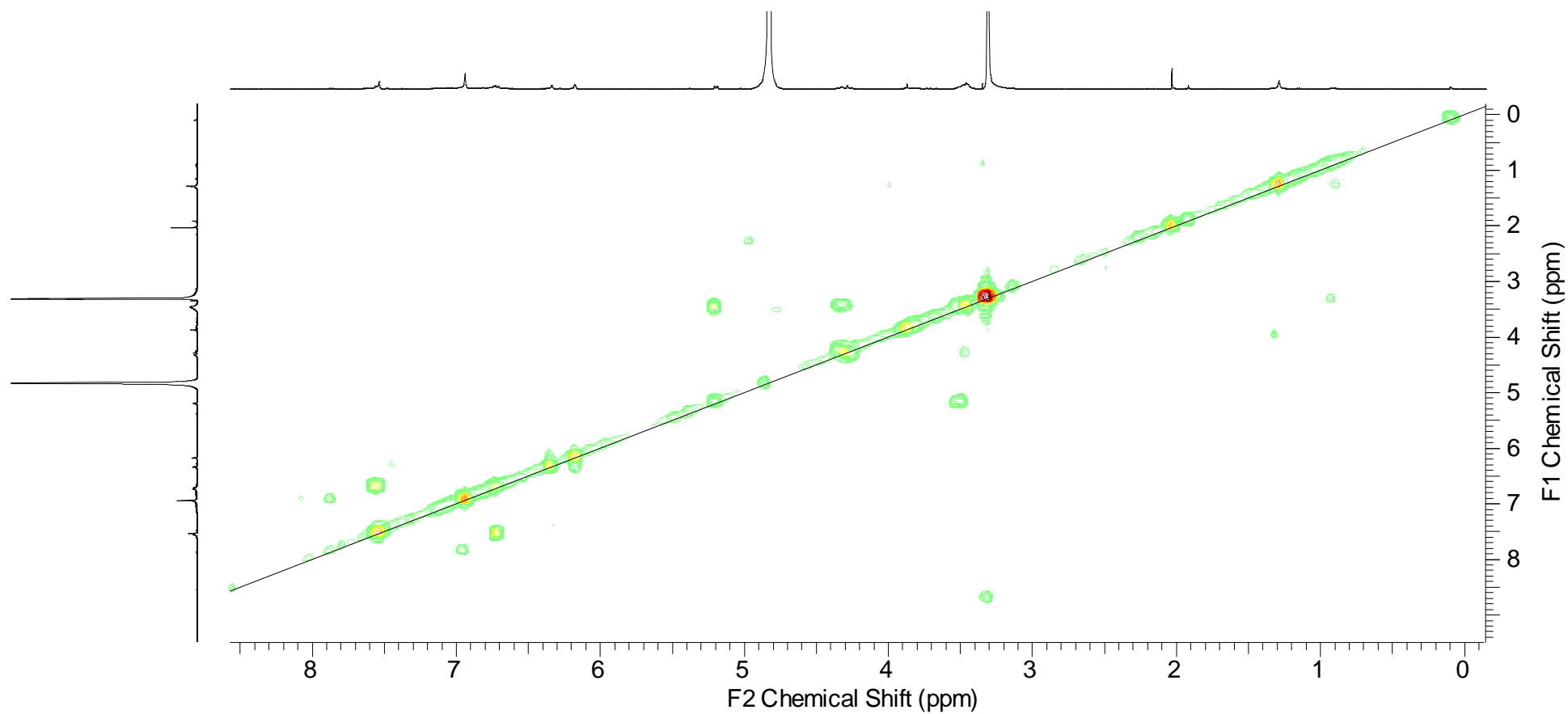
Spectre de RMN ^1H de la quercitine-3-O- β -D-xylofuranoside (3) dans le CD_3OD



Spectre de RMN gHSQCAD de la quercitine-3-*O*- β -D-xylofuranoside (3) dans le CD_3OD

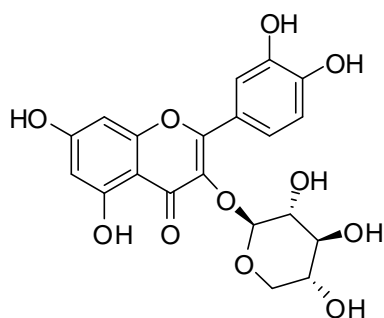


Spectre de RMN gHMBCAD de la quercitine-3-*O*- β -D-xylofuranoside (3) dans le CD₃OD



Spectre de RMN COSY de la quercitine-3-*O*- β -D-xylofuranoside (3) dans le CD₃OD

Annexe 9 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et gHSQCAD de la reynoutrine (quercitrine-3-O- β -D-xylopyranoside) (4) dans le CD_3OD



$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$

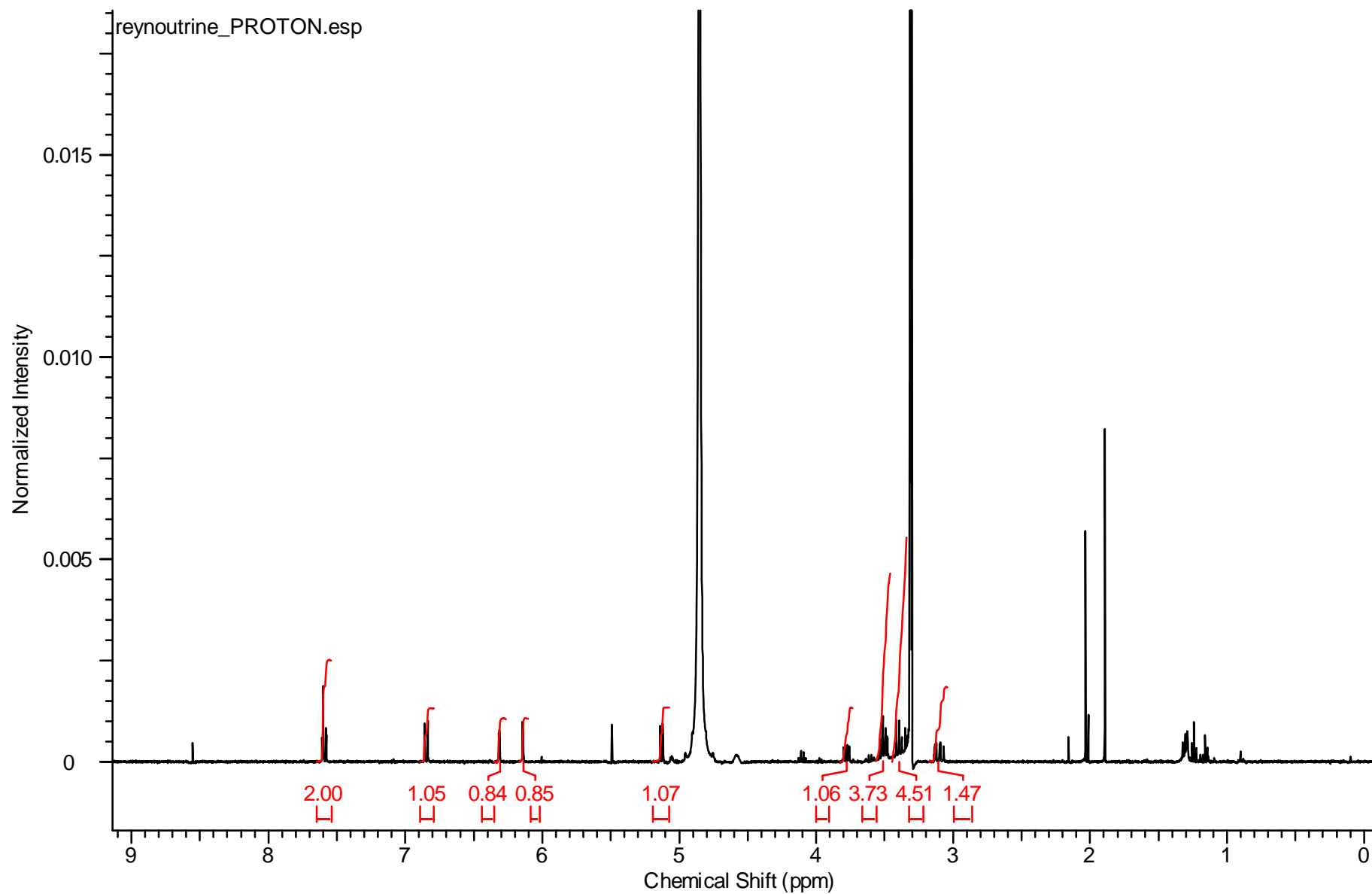
$M = 434,35$

Temps de rétention : $T_r = 11,3$ min (Supelco Discovery® C18, 15 cm x 21,2 mm, 5 μm , élution eau-acétonitrile 83:17 pendant 15 min, débit 1 ml/min).

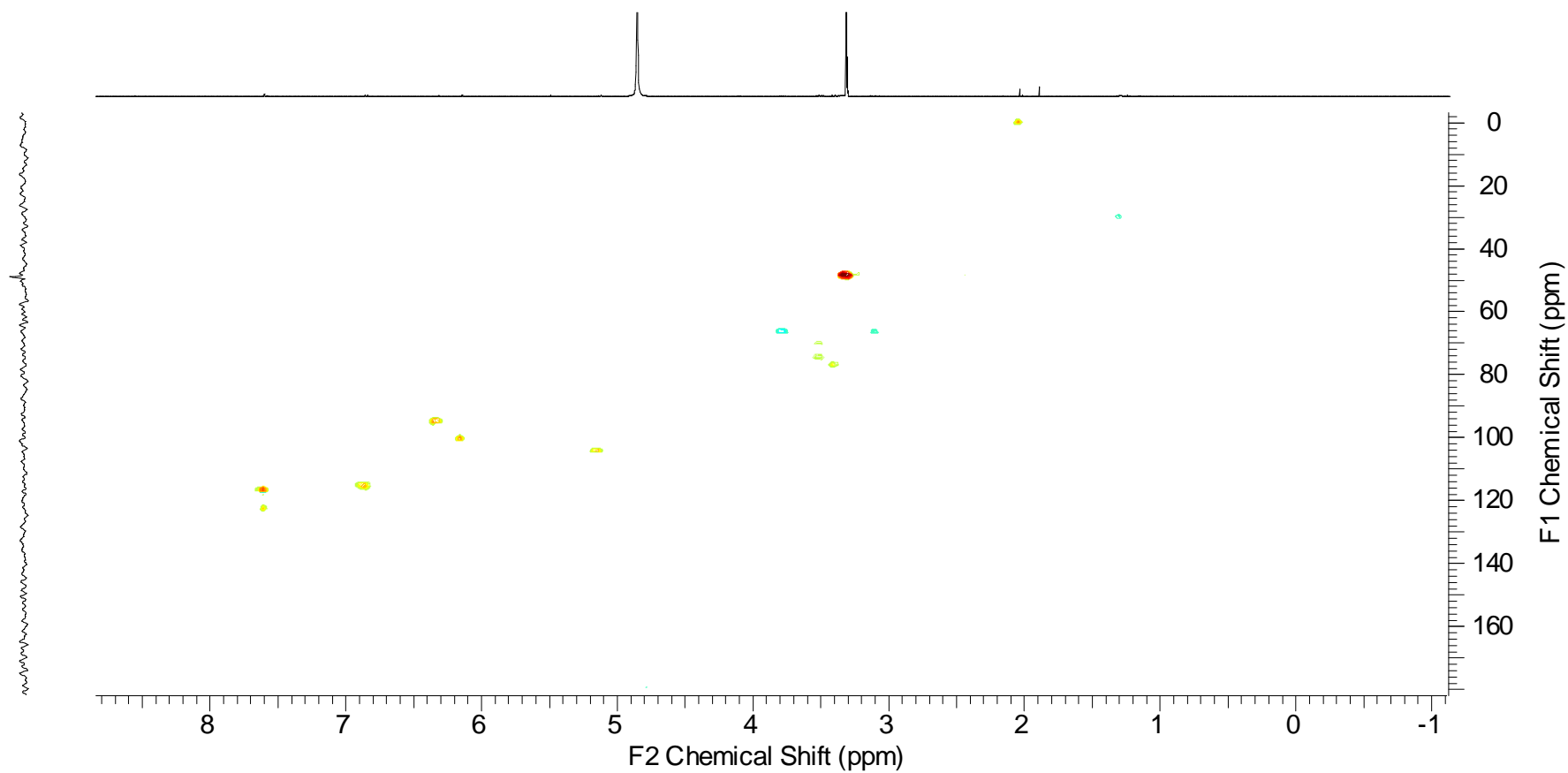
UV, λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) : 254,7 / 354,7 nm

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,60 (dd, $J = 2,1$; 0,5 Hz, 1H, H2') 7,59 (dd, $J = 8,2$; 2,1 Hz, 1H, H6'), 6,85 (dd, $J = 8,2$; 0,5 Hz, 1H, H5'), 6,32 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H6), 6,14 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H8), 5,13 (d, $J = 7,2$ Hz, 1H, H1''), 3,78 (dd, $J = 11,7$; 5,1 Hz, 1H, H5''eq), 3,51 (dd, $J = 8,8$; 7,2 Hz, 1H, H2''), 3,51 (m, 1H, H4''), 3,39 (brt, $J = 8$., Hz, 1H, H3''), 3,10 (dd, $J = 11,7$; 9,5 Hz, 1H, H5''ax).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD) δ ppm 158,4 (C5), 158,0 (C2), 149,6 (C4'), 145,7 (C3'), 134,9 (C3), 123,0 (C6'), 122,6 (C1'), 116,8 (C2'), 115,7 (C5'), 104,6 (C1''), 104,1 (C10), 100,7 (C8), 95,2 (C6), 77,4 (C3''), 75,0 (C2''), 70,8 (C4''), 66,9 (C5'').

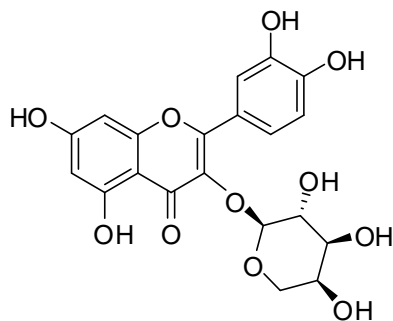


Spectre de RMN ^1H de la reynoutrine (quercitine-3-*O*- β -D-xylopyranoside) (4) dans le CD_3OD



Spectre de RMN gHSQCAD de la reynoutrine (quercitine-3-*O*-β-D-xylopyranoside) (4) dans le CD₃OD

Annexe 10 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et gHSQCAD de la quercitine-3-O- α -L-arabinopyranoside (5) dans le CD_3OD



$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$

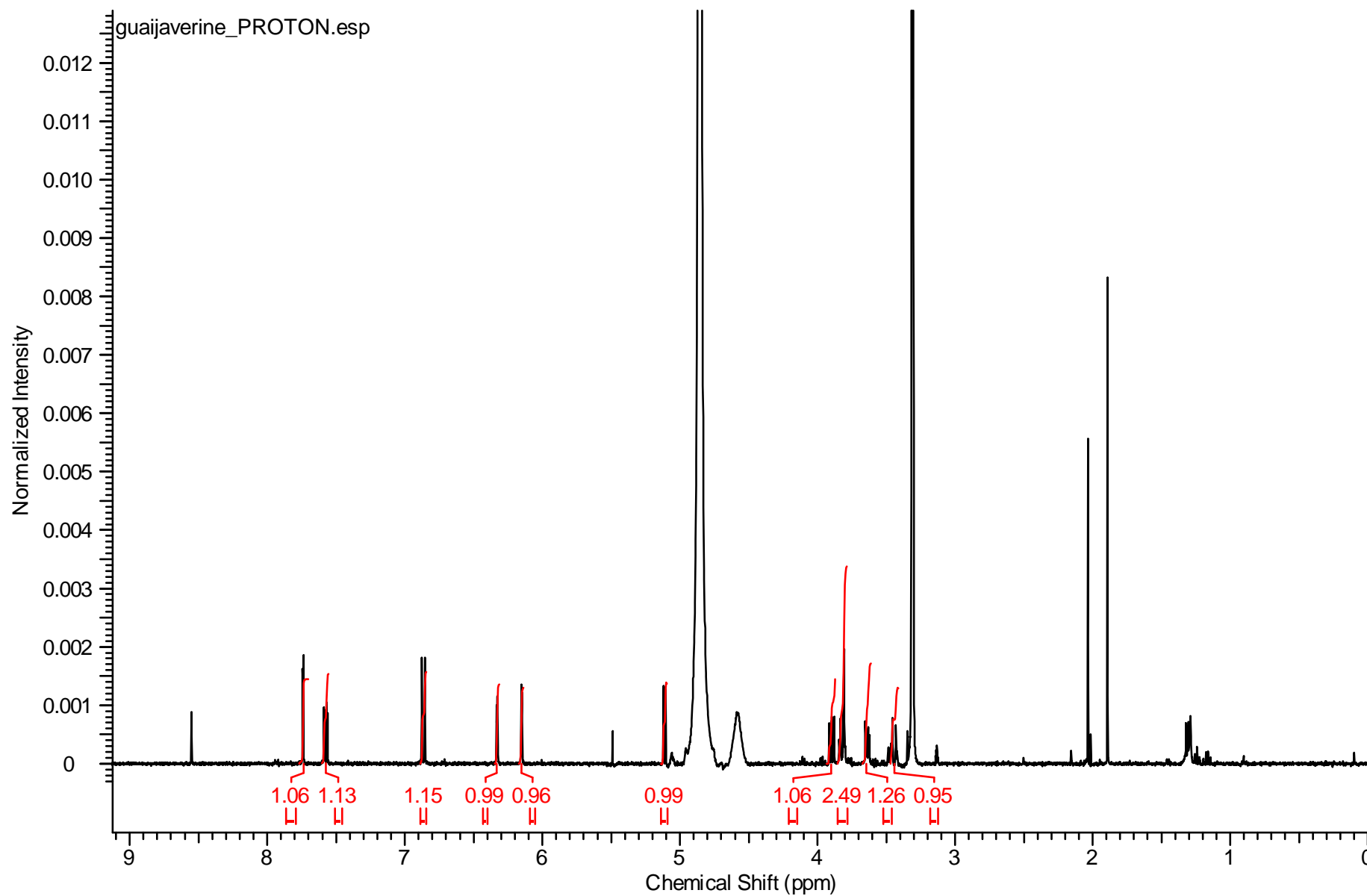
$M = 434,35$

Temps de rétention : $T_r = 12,7$ min (Supelco Discovery® C18, 15 cm x 21,2 mm, 5 μm , élution eau-acétonitrile 83:17 pendant 15 min, débit 1 ml/min).

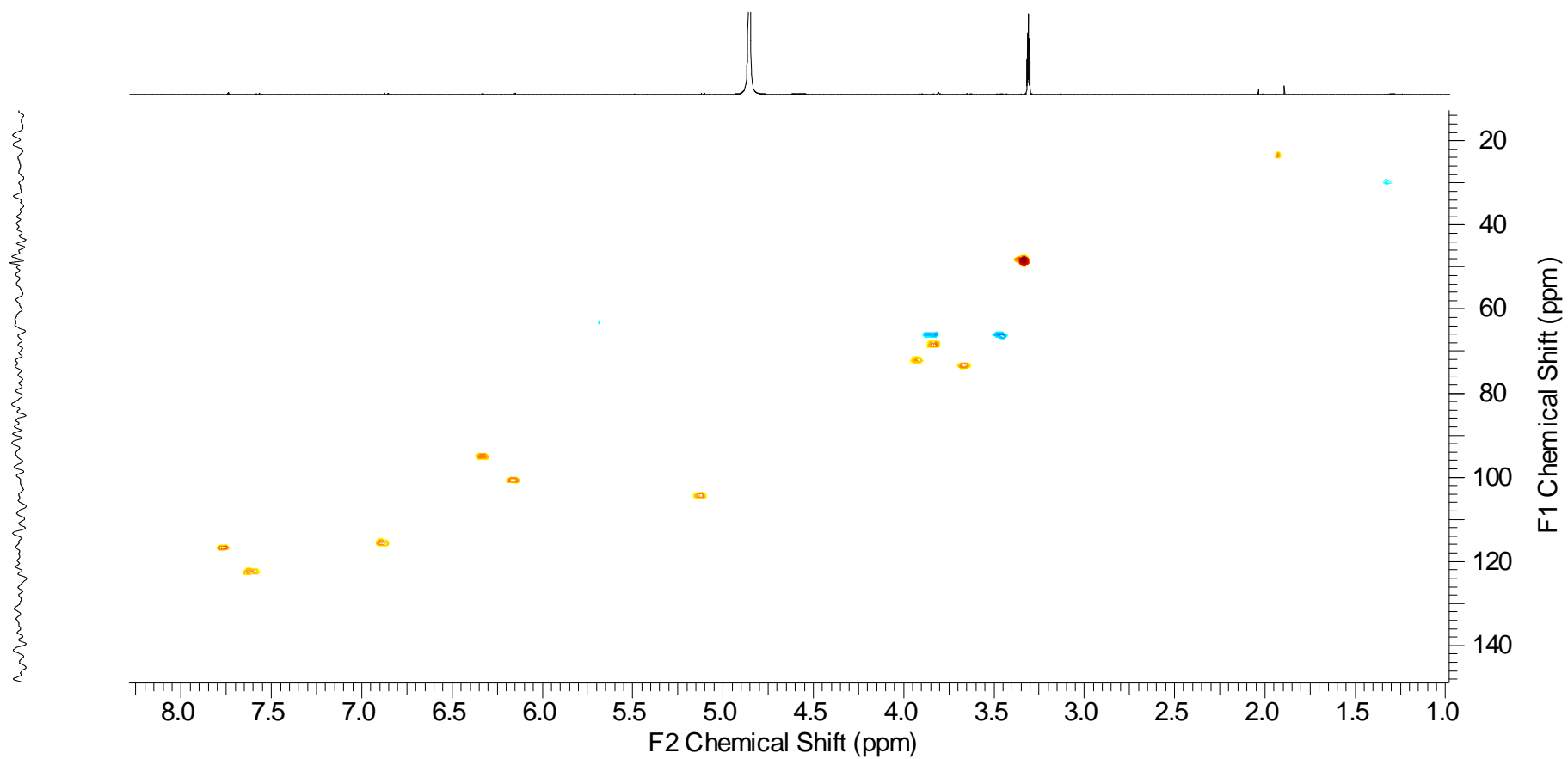
UV, λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) : 254,7 / 358,8 nm

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,74 (d, $J = 2,2$ Hz, 1H, H2'), 7,58 (dd, $J = 8,5$; 2,2 Hz, 1H, H6'), 6,86 (d, $J = 8,5$ Hz, 1H, H5'), 6,33 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H6), 6,15 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H8), 5,11 (d, $J = 6,6$ Hz, 1H, H1''), 3,90 (dd, $J = 8,4$; 6,6 Hz, 1H, H2''), 3,82 (dd, $J = 12,4$; 2,9 Hz, 1H, H5''b), 3,81 (m, 1H, H4''), 3,64 (dd, $J = 8,4$; 3,2 Hz, 1H, H3''), 3,44 (dd, $J = 12,4$; 3,0 Hz, 1H, H5''a)

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD) δ ppm 186,5 (C4), 158,6 (C5), 157,8 (C2), 149,9 (C4'), 145,8 (C3'), 135,1 (C3), 122,6 (C6'), 122,5 (C1'), 117,0 (C2''), 115,9 (C5'), 104,7 (C1''), 100,9 (C8), 95,4 (C6), 74,0 (C3''), 72,7 (C2''), 68,9 (C4''), 66,8 (C5'').

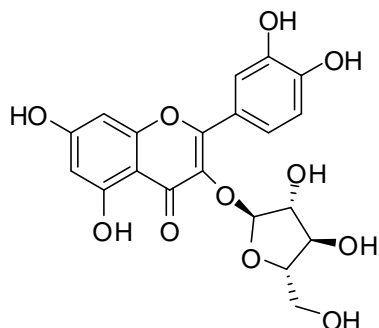


Spectre de RMN ^1H de la guajaverine (quercitine-3-*O*- α -L-arabinopyranoside) (5) dans le CD_3OD



Spectre de RMN gHSQCAD de la guajaverine (quercitine-3-*O*- α -L-arabinopyranoside) (5) dans le CD_3OD

Annexe 11 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et gHSQCAD de l'avicularine (quercitine-3- O - α -L-arabinofuranoside) (6) dans le CD_3OD



$\text{C}_{20}\text{H}_{18}\text{O}_{11}$

$M = 434,35$

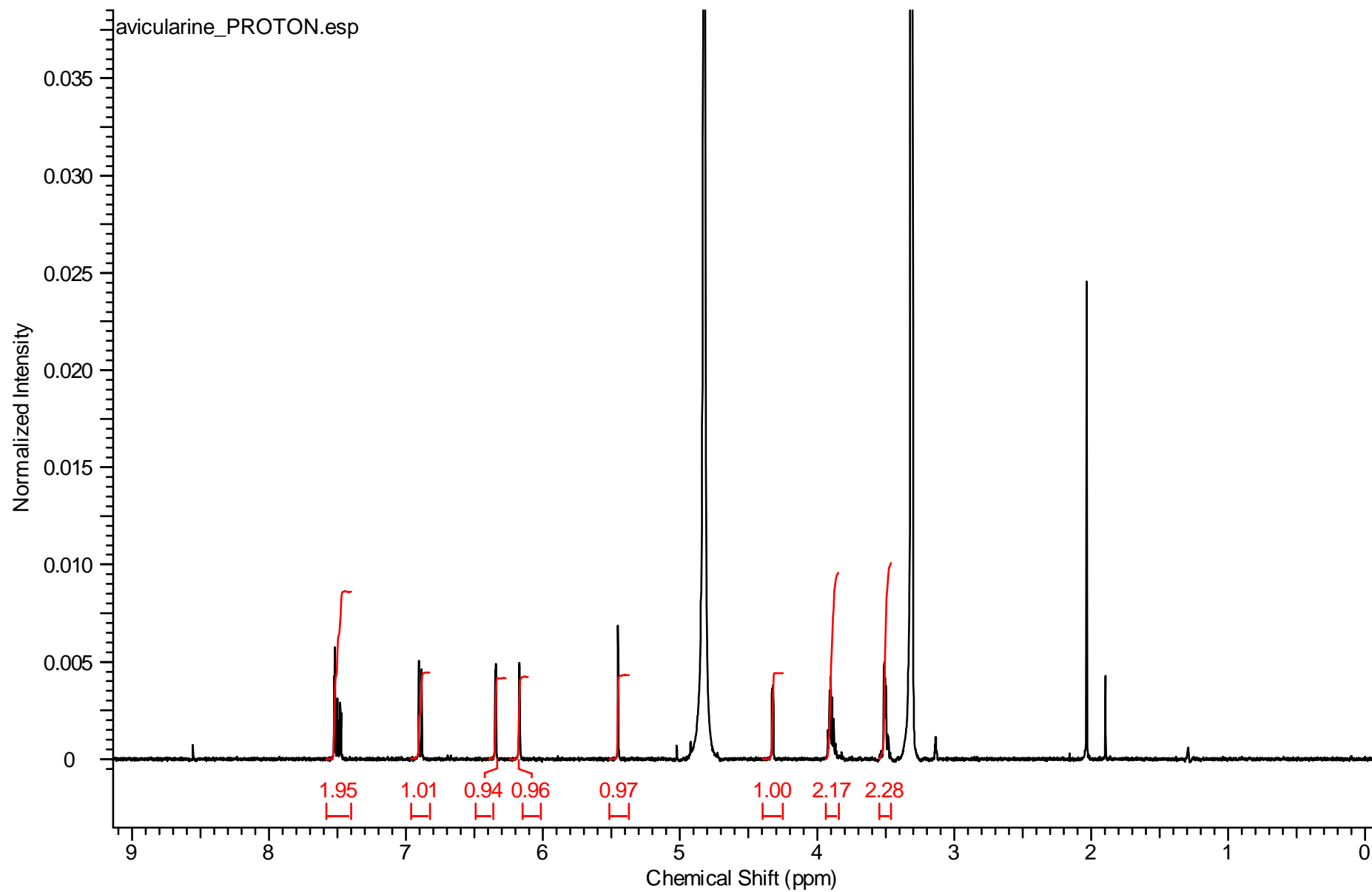
Temps de rétention : $T_r = 13,7$ min (Supelco Discovery® C18, 15 cm x 21,2 mm, 5 μm , élution eau-acétonitrile 83:17 pendant 15 min, débit 1 ml/min).

UV, λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) : 255,9 / 351,1 nm

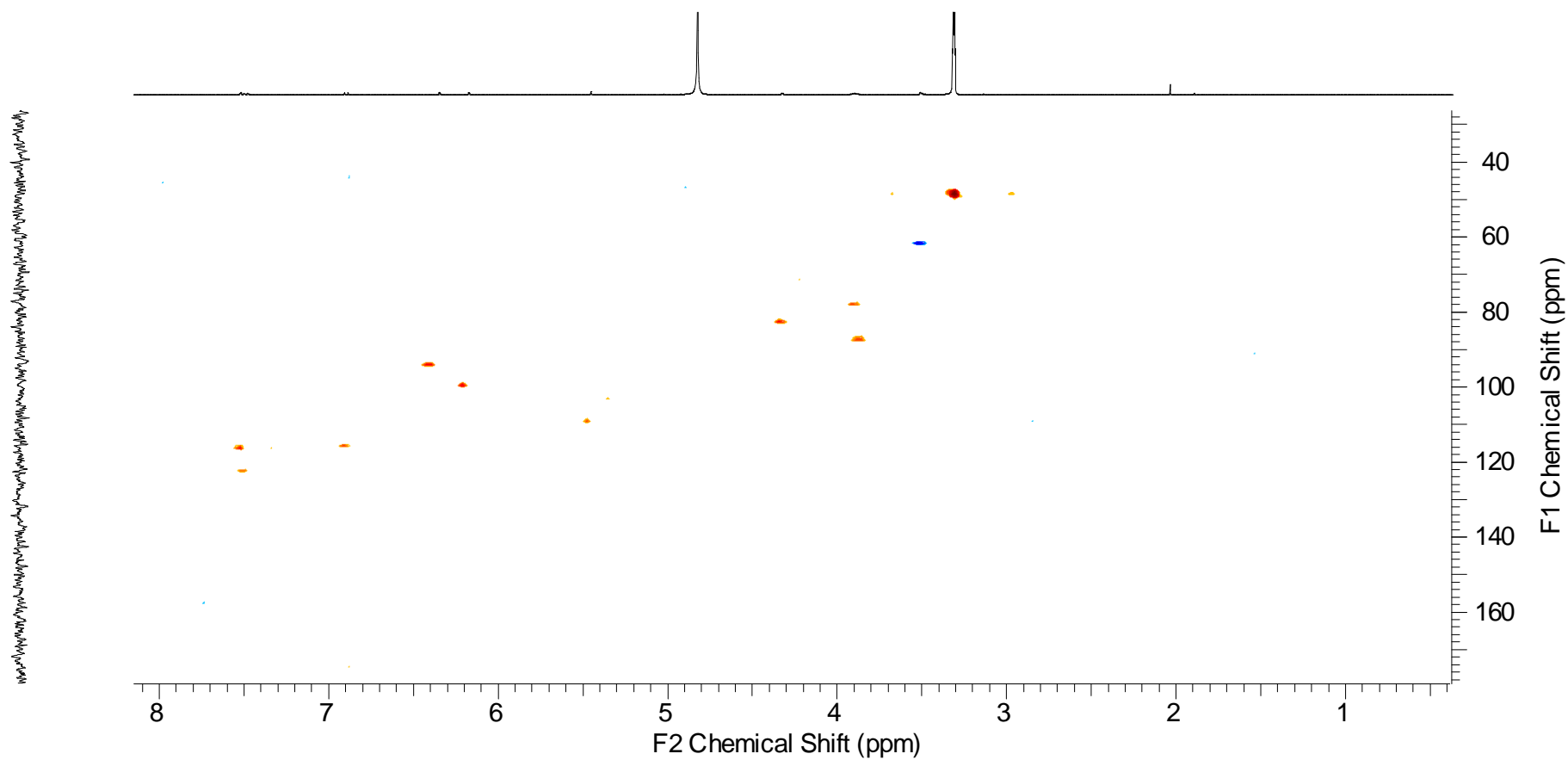
$[\alpha]_D^{27}$ = -56 (c 0,208 ; CH_3OH)

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,52 (d, $J = 2,0$ Hz, 1H, H2'), 7,48 (dd, $J = 8,4$; 2,0 Hz, 1H, H6'), 6,89 (d, $J = 8,4$ Hz, 1H, H5'), 6,34 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H6), 6,17 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H8), 5,45 (brs, 1H, H1''), 4,32 (dd, $J = 2,9$, 1,0 Hz, 1H, H2''), 3,91 (dd, $J = 5,2$; 2,9 Hz, 1H, H3''), 3,87 (brq, $J = 4,5$ Hz, 1H, H4''), 3,49 (m, 1H, H5''a), 3,48 (dd, $J = 12,0$; 4,6 Hz, 1H, H5''b).

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD) δ ppm 167,5 (C9), 162,8 (C7), 158,7 (C2), 158,4 (C5), 149,7 (C4'), 146,2 (C3'), 122,8 (C1'), 122,6 (C6'), 116,5 (C2'), 116,1 (C5'), 109,3 (C1''), 104,6 (C10), 99,7 (C8), 94,5 (C6), 87,7 (C4''), 83,0 (C2''), 78,4 (C3''), 62,2 (C5'').

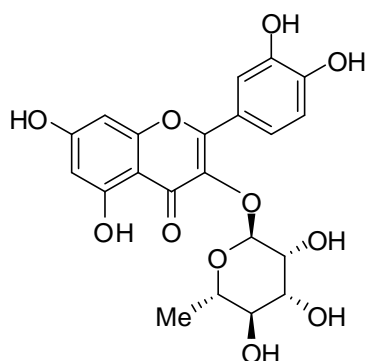


Spectre de RMN ^1H de l'avicularine (quercitine-3- O - α -L-arabinofuranoside) (6) dans le CD_3OD



Spectre de RMN gHSQCAD de l'avicularine (quercitine-3-*O*- α -L-arabinofuranoside) (6) dans le CD₃OD

Annexe 12 : Fiche produit et spectres de RMN ^1H et gHSQCAD de la quercitrine (quercitrine-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside) (7) dans le CD_3OD



$\text{C}_{21}\text{H}_{20}\text{O}_{11}$

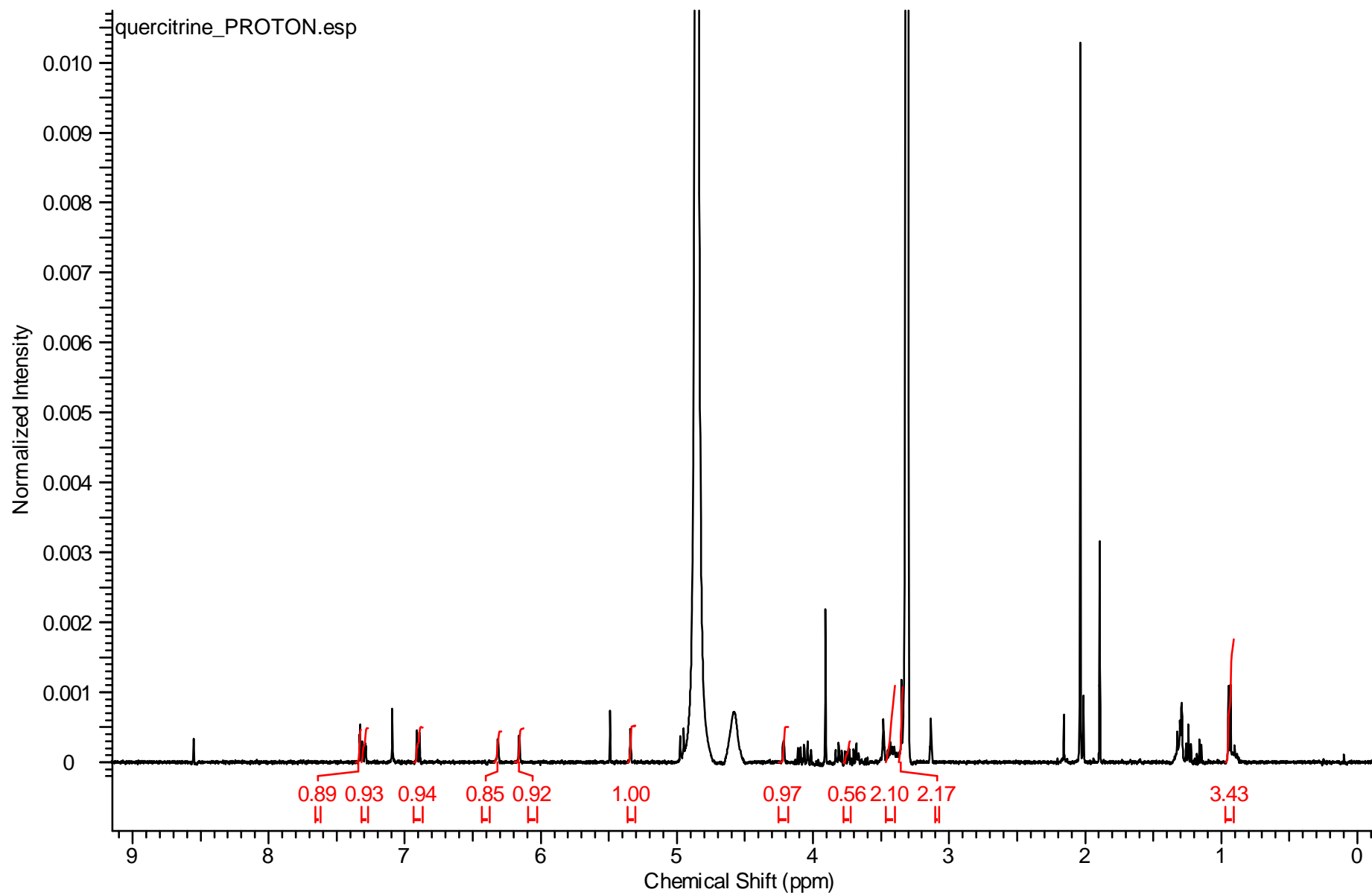
$M = 448,38$

Temps de rétention : $T_r = 14,5$ min (Supelco Discovery® C18, 15 cm x 21,2 mm, 5 μm , élution eau-acétonitrile 83:17 pendant 15 min, débit 1 ml/min).

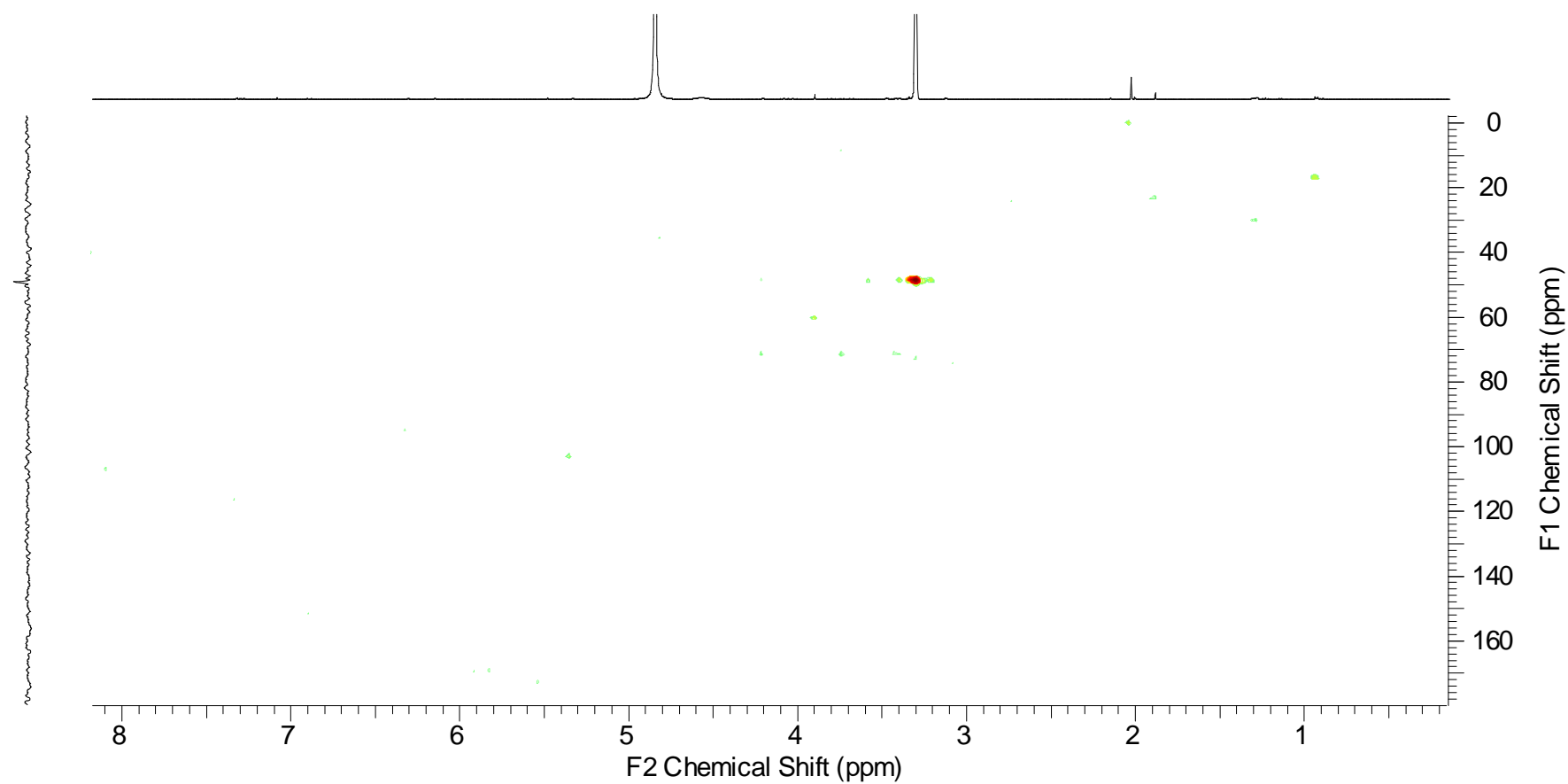
UV, λ_{max} ($\text{H}_2\text{O}/\text{ACN}$) : 254,7 / 345,1 nm

^1H NMR (400 MHz, CD_3OD) δ ppm 7,33 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H2'), 7,30 (dd, $J = 8,2$; 2,1 Hz, 1H, H6'), 6,90 (d, $J = 8,2$ Hz, 1H, H5'), 6,31 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H, H6), 6,15 (d, $J = 2,1$ Hz, 1H), 5,34 (d, $J = 1,7$ Hz, 1H), 4,21 (dd, $J = 3,4$; 1,7 Hz, 1H, H2''), 3,74 (dd, $J = 9,4$; 3,4 Hz, 1H, H3''), 3,42 (m, 1H, H5''), 3,34 (m, 1H, H4''), 0,94 (d, $J = 6,1$ Hz, 3H, H6'').

^{13}C NMR (100.6 MHz, CD_3OD) δ ppm 149,4 (C4'), 122,8 (C1'), 122,5 (C6'), 116,6 (C2'), 116,1 (C5'), 103,4 (C1''), 100,5 (C8), 95,1 (C6), 72,7 (C4''), 71,8 (C2''), 71,8 (C3''), 17,4 (C6'').



Spectre de RMN ^1H de la quercitrine (quercitrine-3-*O*- α -L-rhamnopyranoside) (7) dans le CD_3OD



Spectre de RMN gHSQCAD de la quercitrine (quercitine-3-O- α -L-rhamnopyranoside) (7) dans le CD₃OD

Annexe 13 : Composition chimique de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* (Linden) Ronse

<i>IK exp</i> ⁽¹⁾	<i>Concentration relative (%)</i> ⁽²⁾	<i>Composés</i> ⁽³⁾	<i>IK Courtois 2009</i> ⁽⁴⁾	<i>IK Adams 1995</i> ⁽⁵⁾	<i>Identification</i> ⁽⁶⁾	<i>Formule</i>
Monoterpènes						
Acycliques						
990	0,06	β-myrcène	992	991	RI, MS, HE, S	C ₁₀ H ₁₆
1100	0,17	linalol	1103	1098	RI, MS, HE, S	C ₁₀ H ₁₈ O
Menthanes						
1020	0,09	α-terpinène	1022	1018	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₆
1028	0,66	para-cymène	1030	1030	RI, MS, HE, S	C ₁₀ H ₁₄
1033	0,40	limonène	1034	1031	RI, MS, HE, S	C ₁₀ H ₁₆
1035	0,01	β-phellandène	1036	1031	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₆
1037	<i>tr</i>	1,8-cinéole	1038		RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₈ O
1062	0,19	γ-terpinène	1062	1062	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₆
1088	0,07	terpinolène	1089	1088	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₆
1093	0,09	para-cymenène	1096		RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₂
1126	0,25	trans-para-mentha-2,8-diène-1-ol		1123	RI, MS	C ₁₀ H ₁₆ O
1142	0,12	cis-para-mentha-2,8-diène-1-ol		1134	RI, MS	C ₁₀ H ₁₆ O
1185	0,61	terpinène-4-ol	1188	1177	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₈ O
1191	0,16	trans-para-mentha-1(7), 8-diène-2-ol		1185	RI, MS	C ₁₀ H ₁₆ O
1223	0,09	trans-carvéol		1229	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₆ O
1228	0,04	cuménol*			MS	C ₉ H ₁₂ O
1235	0,19	menthadiénol *			MS	C ₁₀ H ₁₆ O
1249	0,56	cuminaldéhyde		1239	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₂ O
1295	0,07	para-cymène-7-ol		1287	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₄ O
Pinanes et dérivés						
936	1,28	α-pinène	940	939	RI, MS, HE, S	C ₁₀ H ₁₆
954	0,06	camphène	958	953	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₆
981	0,84	β-pinène	985	980	RI, MS, HE, S	C ₁₀ H ₁₆
1147	4,35	trans-pinocarvéol	1149	1139	RI, MS, HE, S, RMN	C ₁₀ H ₁₆ O
1169	2,63	pinocarvone	1170	1162	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₄ O
1182	0,03	cis-pinocamphone		1160	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₆ O
1195	0,03	myrténol		1194	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₆ O
1199	5,59	myrténal	1204	1193	RI, MS, HE, S, RMN	C ₁₀ H ₁₄ O
1270	0,09	trans-myrtanol		1258	RI, MS	C ₉ H ₁₆ O
1327	0,10	acétate de myrtényle		1325 (a)	RI, MS	C ₁₂ H ₁₈ O ₂
1388	0,04	acétate de myrtanyle*		1381 (b)	RI, MS	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
Thujanes						
928	0,02	α-thujène	932	931	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₆
958	0,01	thujadiène (thuja-2,4(10)-diène)		957	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₄
976	0,91	sabinène	978	976	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₆
1074	0,13	hydrate de cis-sabinène (thujanol)		1068	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₈ O
1103	0,09	hydrate de trans-sabinène		1097	RI, MS	C ₁₀ H ₁₈ O
1165	0,34	sabinacétone		1156	RI, MS, HE	C ₉ H ₁₄ O
1188	0,11	α-thujenal (thuj-3-ène-10-al)		1182 (c)	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₄ O
1298	0,20	acétate de sabinyle*		1298 (a)	RI, MS	C ₁₂ H ₁₈ O ₂
Bornanes						
1132	0,19	α-campholénal	1133	1125	RI, MS, HE	C ₁₀ H ₁₆ O
1288	0,12	acétate de bornyle		1285	RI, MS, HE	C ₁₂ H ₂₀ O ₂
Caranes						
1007	0,02	3-carène	1014	1011	RI, MS	C ₁₀ H ₁₆
1203	0,06	4-trans-caranone			MS	C ₁₀ H ₁₆ O
1212	0,10	4-cis-caranone + NI			MS	C ₁₀ H ₁₆ O
Sesquiterpènes						

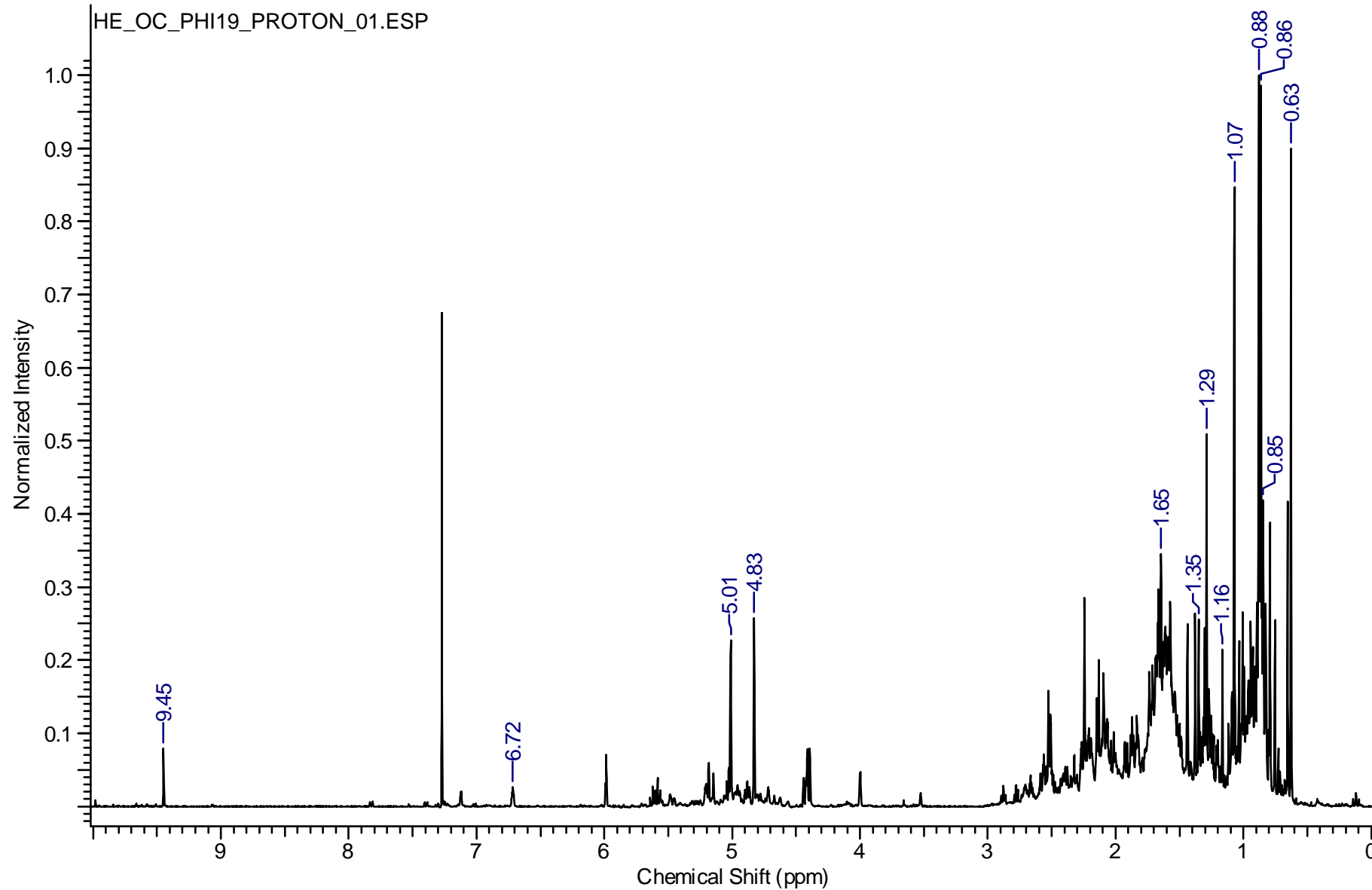
Acycliques						
1607	0,93	β-oplopénone		1607 (d)	RI, MS	C ₁₅ H ₂₄ O
Humulanes et caryophyllanes						
1424	0,52	β-caryophyllène	1427	1454	RI, MS, S	C ₁₅ H ₂₄
1461	10,56	α-humulène	1462	1454	RI, MS, HE, S, RMN	C ₁₅ H ₂₄
1586	0,56	oxyde de caryophyllène	1592	1578 (a), 1583 (e)	RI, MS, HE	C ₁₅ H ₂₄ O
1613 / 1614	5,05	NI + oxyde d'humulène II		1608 (f)	RI, MS	C ₁₅ H ₂₄ O
1641	0,19	caryophylla-7(12),8-dièn-5-ol		1619 (g), 1629 (h)	RI, MS	C ₁₅ H ₂₄ O
Germacrane et dérivés						
1465	1,03	alloaromadendrène	1467	1461	RI, MS, HE	C ₁₅ H ₂₄
1485	0,03	germacrène D	1487	1480	RI, MS	C ₁₅ H ₂₄
1506	0,33	bicyclgermacrène	1502		RI, MS	C ₁₅ H ₂₄
1574	0,07	palustrol	1581	1567 (h)	RI, MS	C ₁₅ H ₂₆ O
1599	5,11	viridiflorol		1600 (i)	RI, MS, RMN	C ₁₅ H ₂₆ O
1638	4,06	bulnésol*		1666	RI, MS	C ₁₅ H ₂₆ O
Cadinanes et dérivés						
1351	0,19	α-cubébène	1349	1351	RI, MS	C ₁₅ H ₂₄
1374	0,86	cyclosativène (c) + α-ylangène (y)	1375 (y)	1368 (c)	RI, MS, HE	C ₁₅ H ₂₄ (c) / (y)
1380	8,77	α-copaène	1381	1376	RI, MS, HE, S, RMN	C ₁₅ H ₂₄
1391	0,24	β-cubébène	1385	1390	RI, MS, HE	C ₁₅ H ₂₄
1395	0,12	sativène		1396	RI, MS	C ₁₅ H ₂₄
1454	0,04	cis-muurolo-3,5-diène		1446	RI, MS	C ₁₅ H ₂₄
1476	0,13	trans-cadina-1(6)-4-diène		1475 (i)	RI, MS	C ₁₅ H ₂₄
1479	0,12	γ-muurolène	1480	1477	RI, MS	C ₁₅ H ₂₄
1482	0,09	4,10-époxy-amorphe + NI			MS	C ₁₅ H ₂₆ O
1496	0,22	trans-muurolo-4(14),5-diène		1494 (f)	RI, MS	C ₁₅ H ₂₄
1499	1,33	cis-cubébol			MS	C ₁₅ H ₂₆ O
1501	0,08	α-muurolène	1507		RI, MS	C ₁₅ H ₂₄
1518	1,43	trans-cubébol	1514	1513 (j)	RI, MS	C ₁₅ H ₂₆ O
1520	2,91	δ-cadinène	1521	1524	RI, MS, HE	C ₁₅ H ₂₄
1524	0,68	calaménène*	1526 (trans)		RI, MS	C ₁₅ H ₂₂
1535	0,09	cadina-1,4-diène*	1538 (trans)		RI, MS	C ₁₅ H ₂₄
1544	0,40	α-calacorène		1542, 1546 (k, f)	RI, MS, HE	C ₁₅ H ₂₀
1565	0,10	β-calacorène	1547	1563 (k, f)	RI, MS	C ₁₅ H ₂₀
1582	0,07	epi-OH-β-copaèn-4-α-ol			MS	C ₁₅ H ₂₄ O
1592	23,27	β-copaèn-4-α-ol		1586 (c)	RI, MS, RMN	C ₁₅ H ₂₄ O
1630 / 1631	1,28	β-muurolo-4(10),14-diéol (β-m) + cis-cadin-4-èn-7-ol (c-c)		1637 (c) (l)	RI, MS	C ₁₅ H ₂₄ O (β-m) / C ₁₅ H ₂₆ O (c-c)
1645 / 1647	0,75	cubéol + NI	1624	1642	RI, MS	C ₁₅ H ₂₆ O
1649	0,19	α-muurolol (torreyol)		1645	RI, MS, HE	C ₁₅ H ₂₆ O
1658 / 1659	0,22	α-cadinol (α-c) + cis-calaménèn-10- ol (c-c)	1666 (α-c)	1653 (α-c), 1661 (c-c) (f)	RI, MS	C ₁₅ H ₂₆ O (α-c)/ C ₁₅ H ₂₂ O (c-c)
1668	0,08	trans-calaménèn-10-ol		1669 (f)	RI, MS	C ₁₅ H ₂₂ O
1676	1,33	cadalène	1635	1677 (f)	RI, MS	C ₁₅ H ₁₈
1699	0,05	amorpho-4,9-dièn-2-ol		1679 (m)	RI, MS	C ₁₅ H ₂₄ O
1704 / 1705	0,13	NI + 10-norcalaménèn-10-one		1677 (n)	RI, MS	C ₁₄ H ₁₈ O
Total composés identifiés		94,78				
Non identifiés > 0,1 %						
1491	0,37	NI (M = 218)				
1579	0,27	NI (M = 218)				
1603	0,11	NI (M = 220)				
1651	0,12	NI (M = 220)				
1732	0,16	NI (M = 220)				

⁽¹⁾ IK : indice de rétention ou indice de Kovats calculé à partir d'un mélange de n-alcanes de C₈ à C₂₀ sur colonne VF-5ms ; ⁽²⁾ Pourcentage relatif obtenu à partir de l'aire des pics ; ⁽³⁾ Composition donnée dans l'ordre d'élution sur colonne VF-5ms, m: mélange, NI: non identifié ; ⁽⁴⁾ (Courtois et al., 2009), colonne DB-5ms ; ⁽⁵⁾ Sauf indication d'une autre référence ; ⁽⁶⁾ RI: indice de rétention (Kovats), MS: spectrométrie de masse, S: comparaison avec une injection de standard commercial, HE: comparaison avec une injection d'huile essentielle commerciale de composition connue.

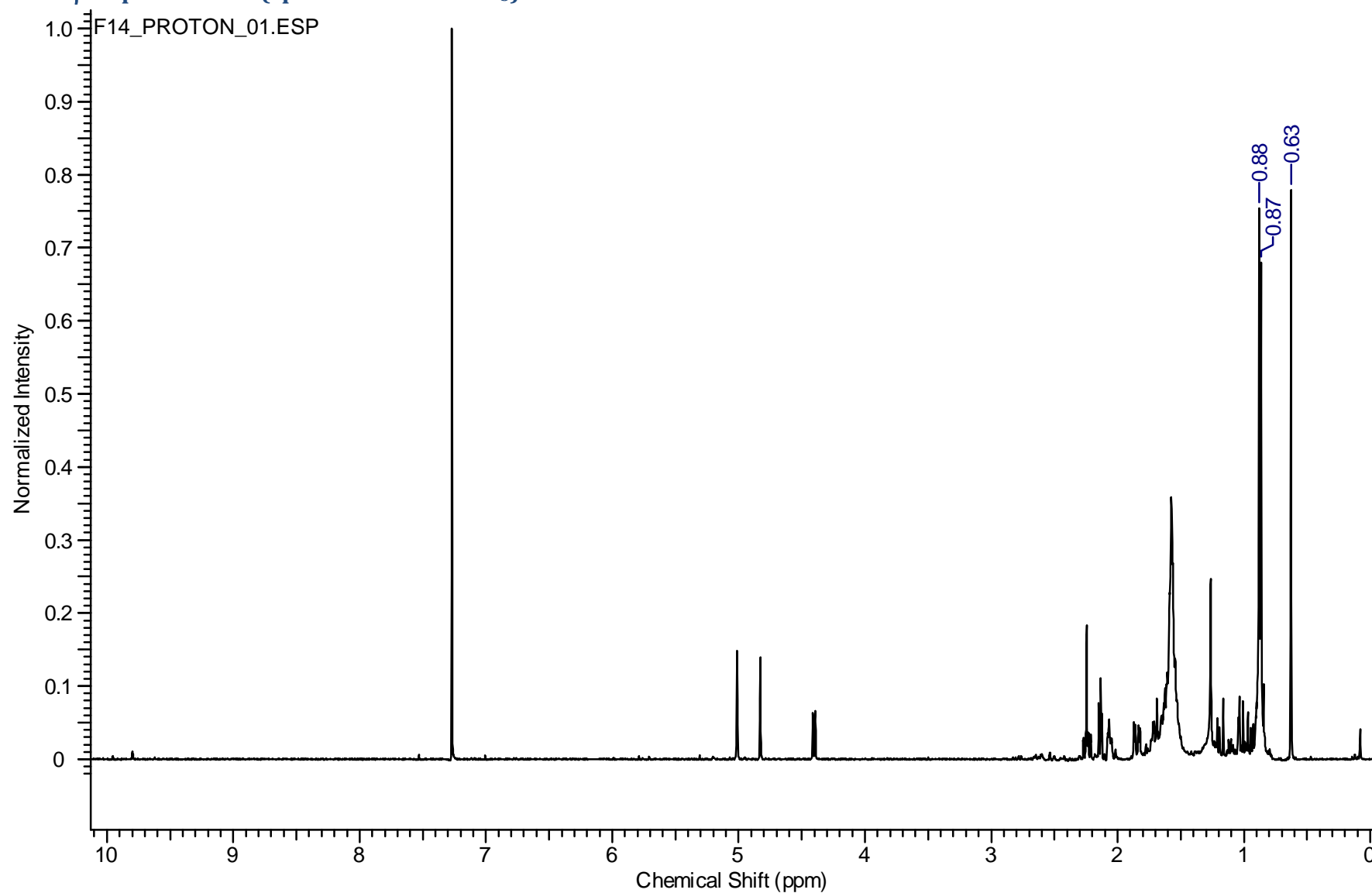
* Isomère non déterminé

Références : (a) (Amparo Blasquez et al., 2003), colonne DB-5 ; (b) (Jordan et al., 2003), colonne HP-5; (c) (Gallori et al., 2001), colonne HP-5 ; (d) (Juliani et al., 2004), colonne HP-5ms ; (e) (Gauvin and Smadja, 2005), colonne HP-5ms ; (f) (Adams et al., 2005), colonne DB-5 ; (g) (Schwob et al., 2004), colonne DB-5 ; (h) (Hazzit et al., 2006), colonne HP-5ms ; (i) (Asuming et al., 2005), colonne HP-5ms; (j) (Adams, 2000), colonne DB-5 ; (k) (Velickovic et al., 2002), colonne HP-5; (l) (Su et al., 2006), colonne DB-5 ; (m) (Stojkovic et al., 2009), colonne DB-5 ; (n) (Silva et al., 2009a), colonne DB-5.

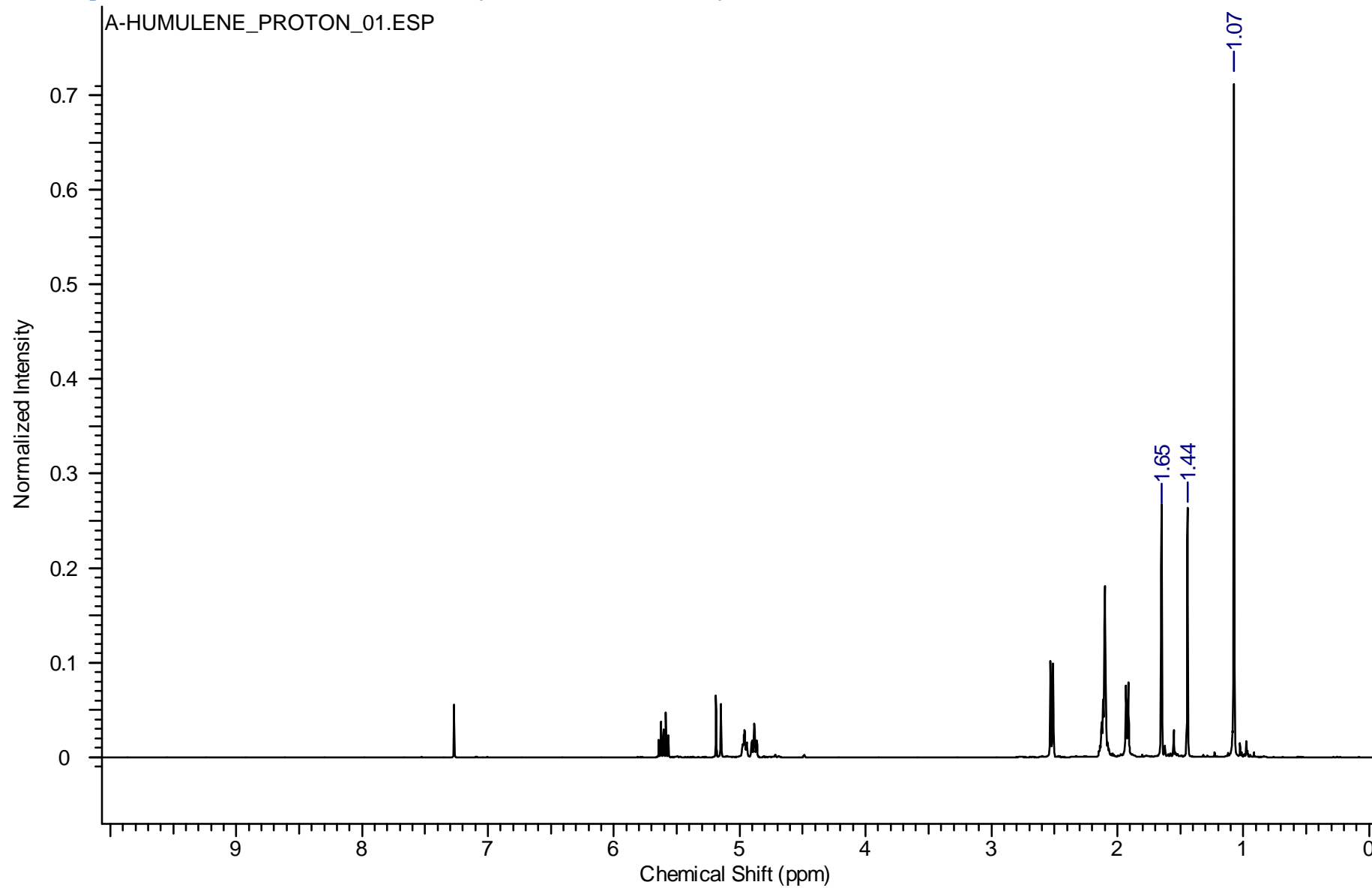
Annexe 14 : Spectre de RMN ^1H de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* (Linden) Ronse (lot 2) dans le CDCl_3



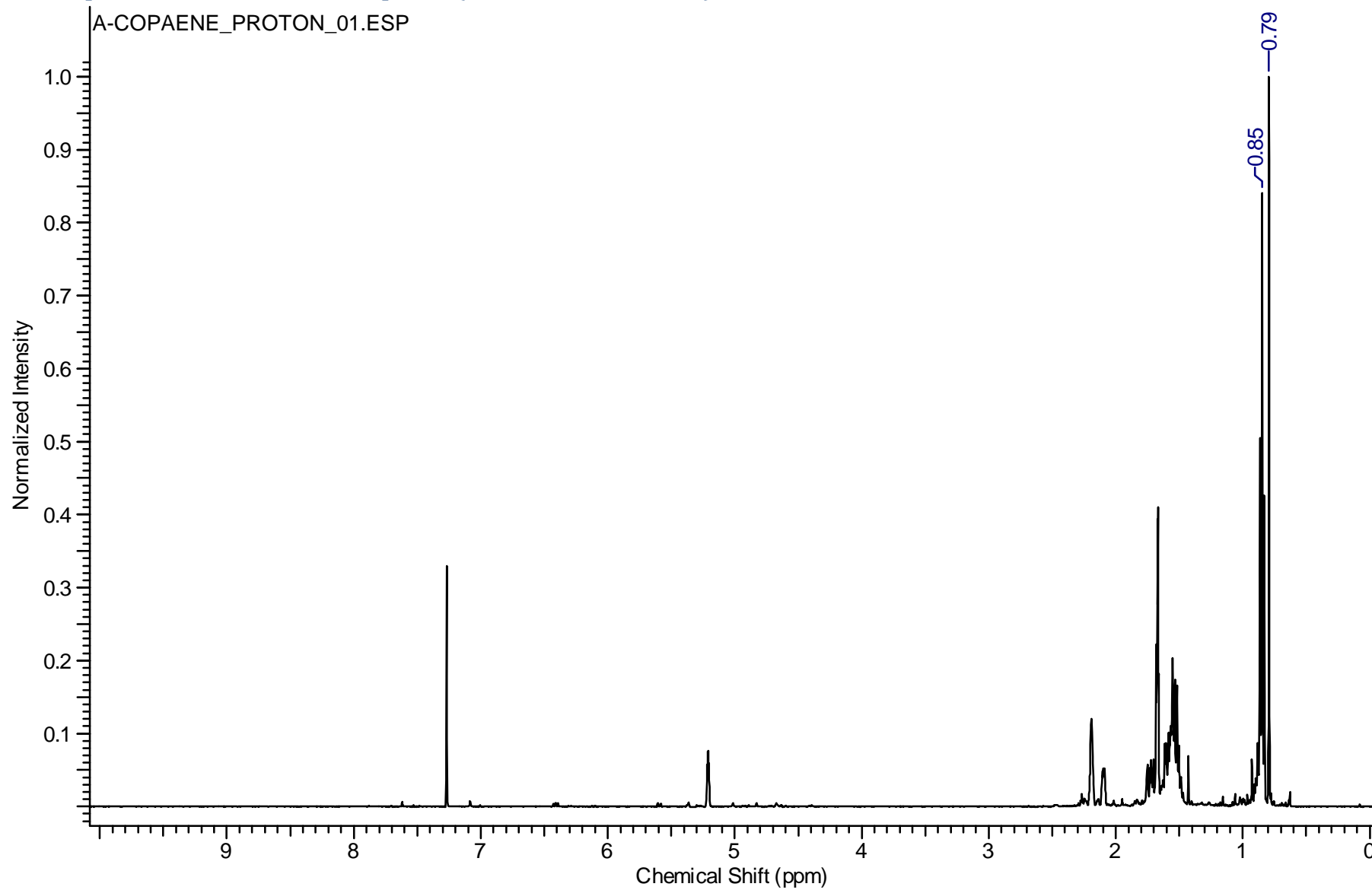
Annexe 15 : Spectre de RMN ^1H de la fraction F14 obtenue à partir de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* (Linden) Ronse (lot 2) et composée de β -copaène-4- α -ol (spectre dans le CDCl_3)



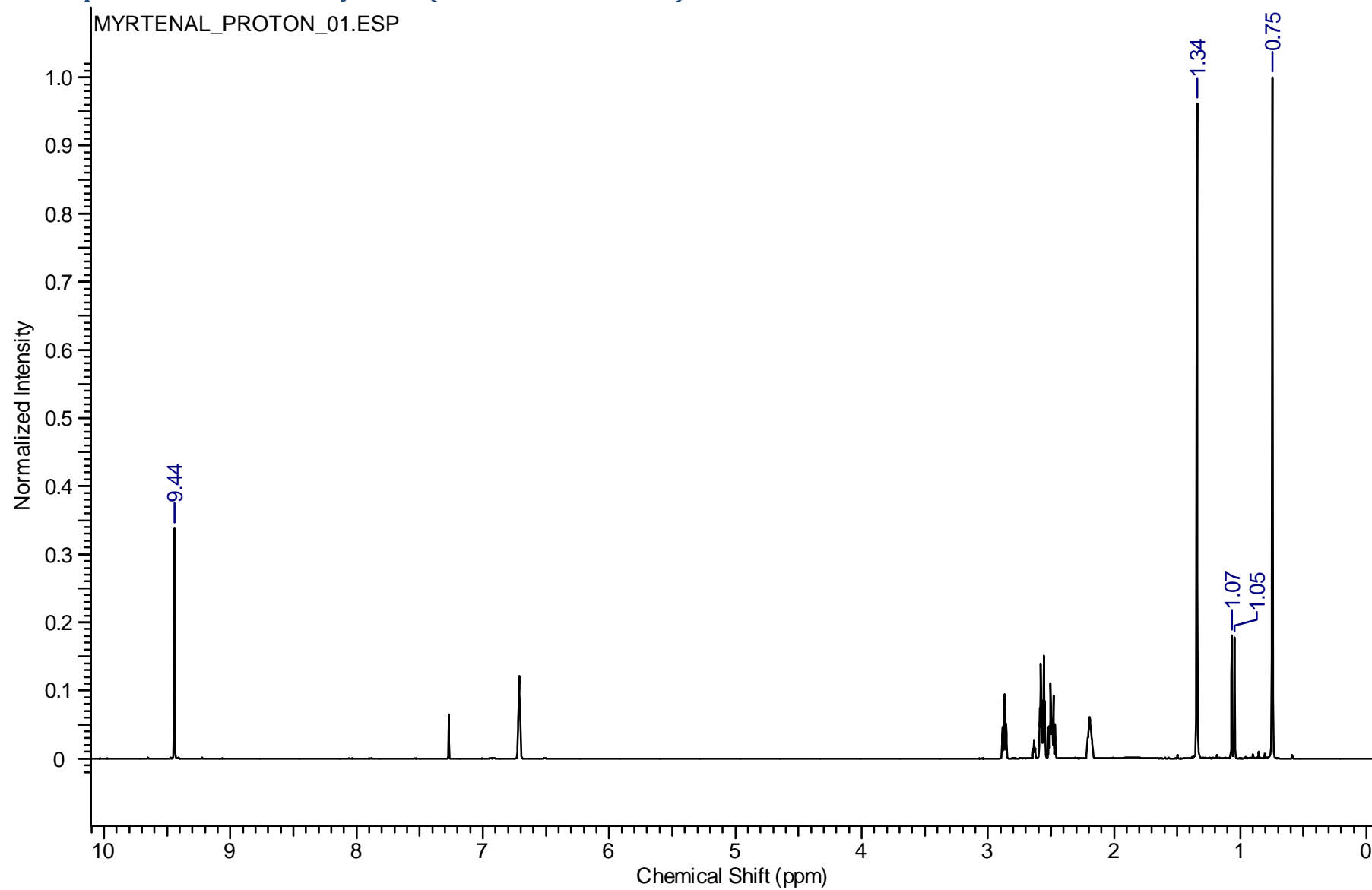
Annexe 16 : Spectre de RMN ^1H de l' α -humulène (standard commercial) dans le CDCl_3



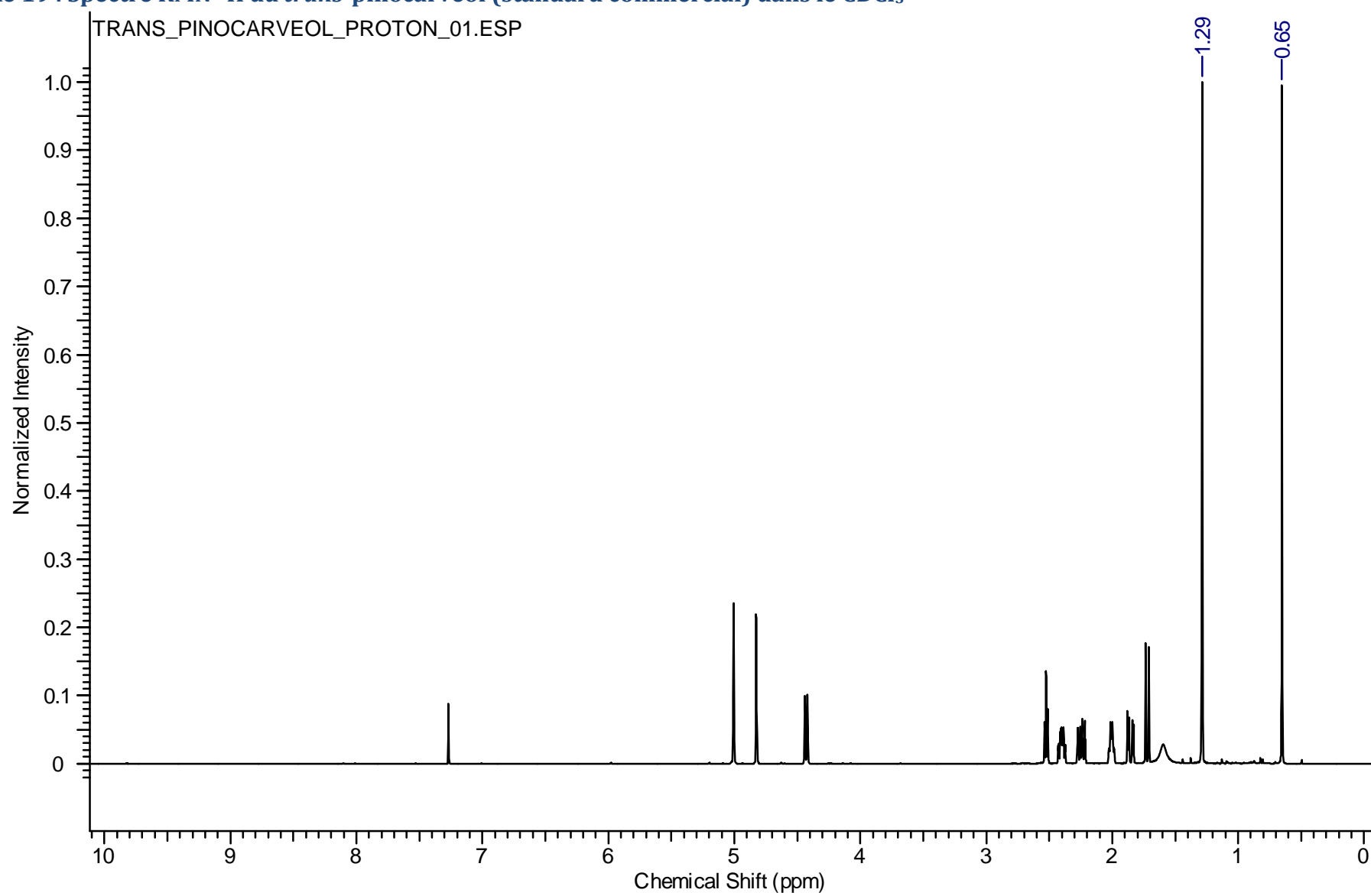
Annexe 17 : Spectre de RMN ^1H de l' α -copaène (standard commercial) dans le CDCl_3



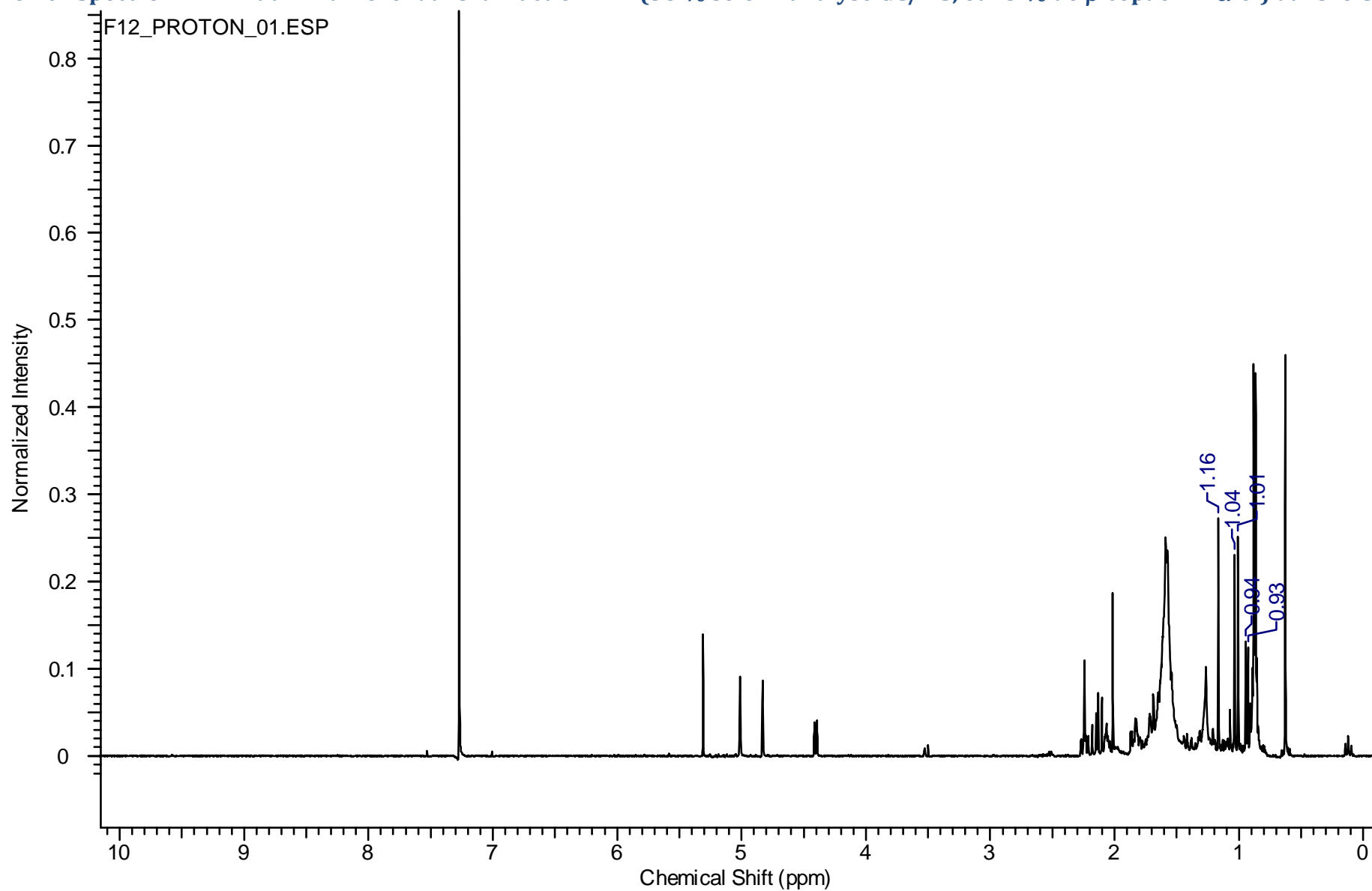
Annexe 18 : Spectre de RMN ^1H du myrténal (standard commercial) dans le CDCl_3



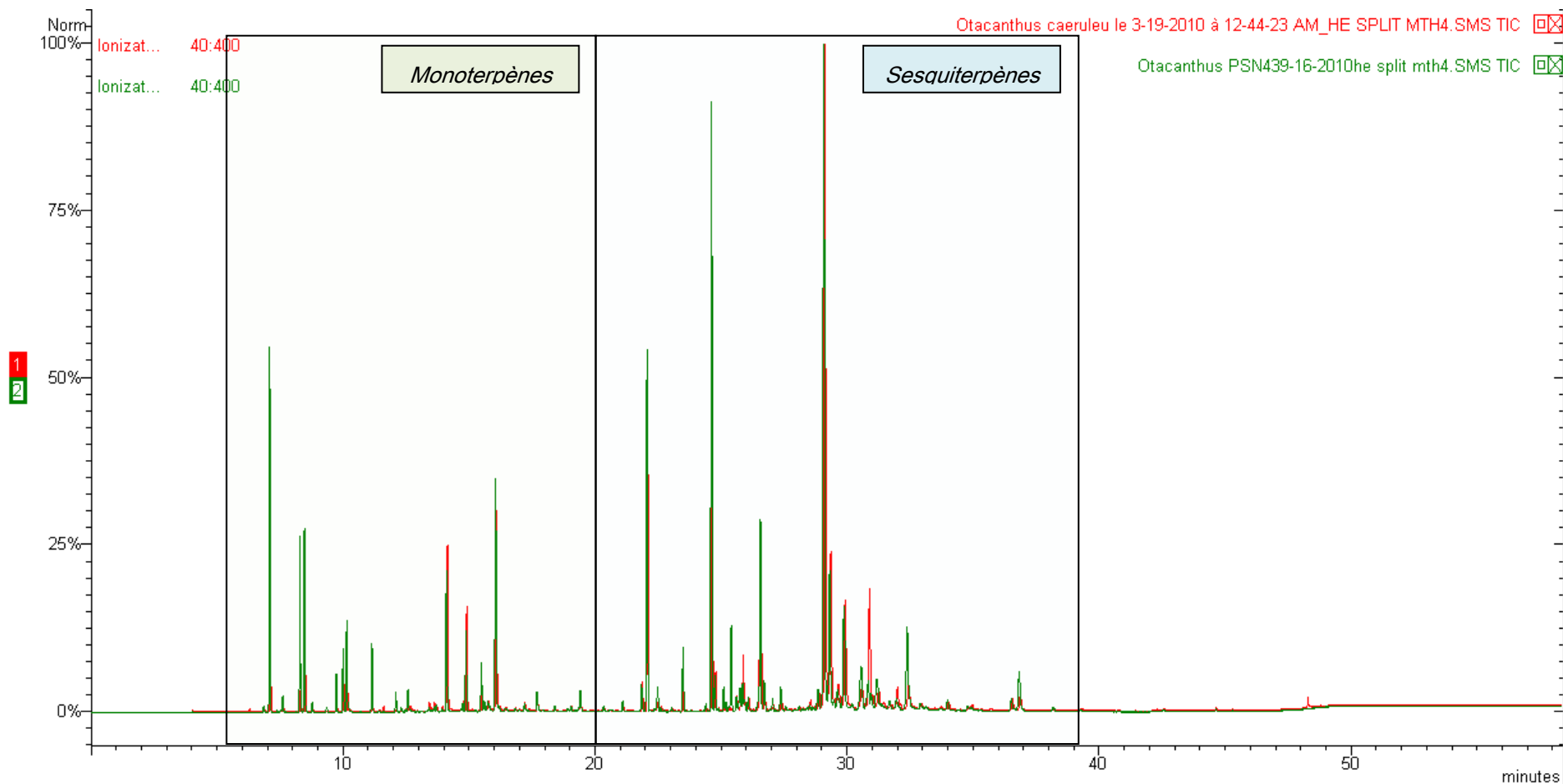
Annexe 19 : Spectre RMN ^1H du *trans*-pinocarvéol (standard commercial) dans le CDCl_3

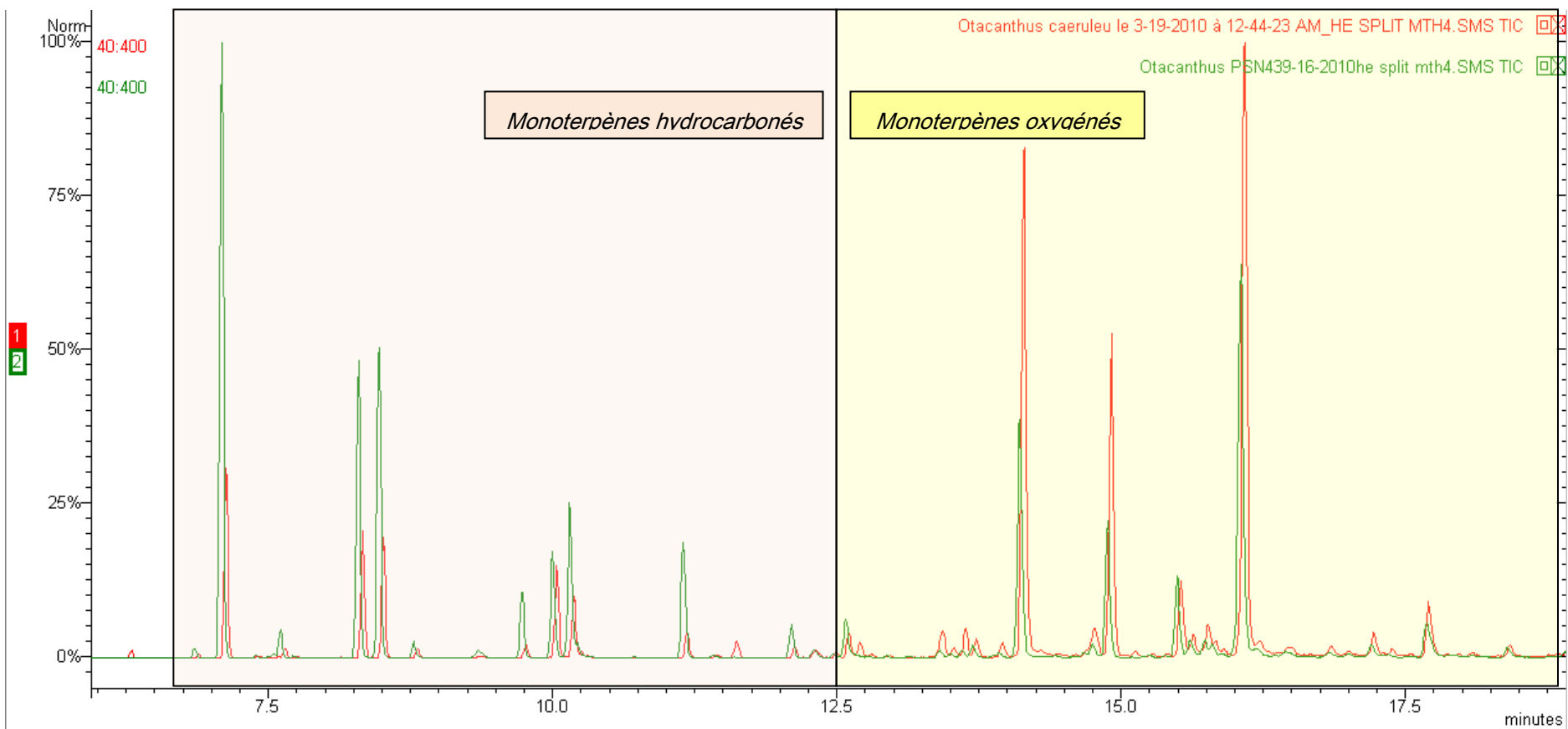


Annexe 20 : Spectre RMN ^1H du viridiflorol dans la fraction F12 (38 % selon l'analyse GC/MS, et 23 % de β -copaèn-4- α -ol) dans le CDCl_3



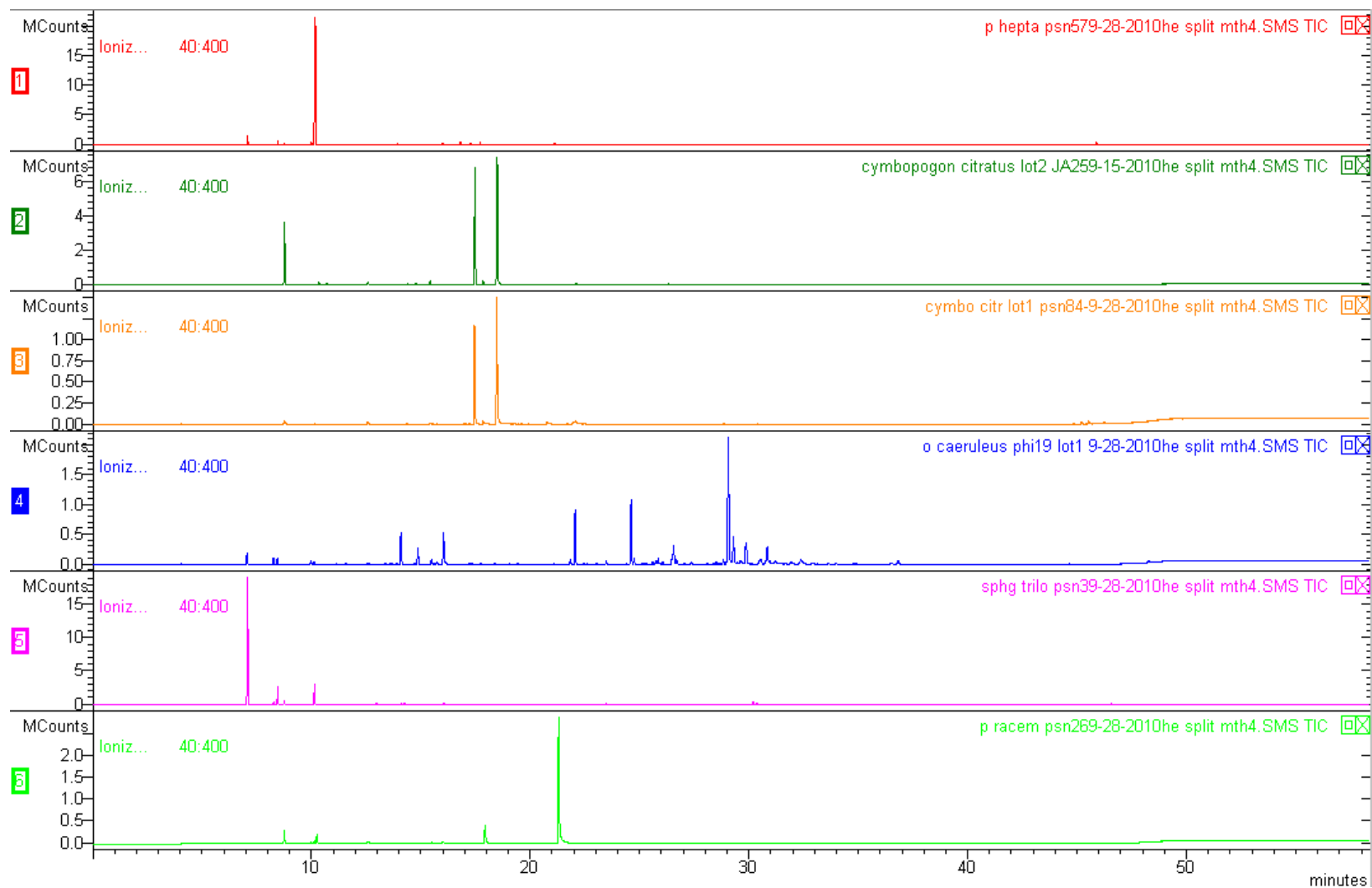
Annexe 21 : Comparaison des chromatogrammes (normalisés) obtenus pour les deux lots d'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* (Linden) Ronse : lot 1 PSN43 (mars 2007) et lot 2 Phi19 (mars 2008) : chromatogramme complet et focalisation sur la zone des monoterpènes.



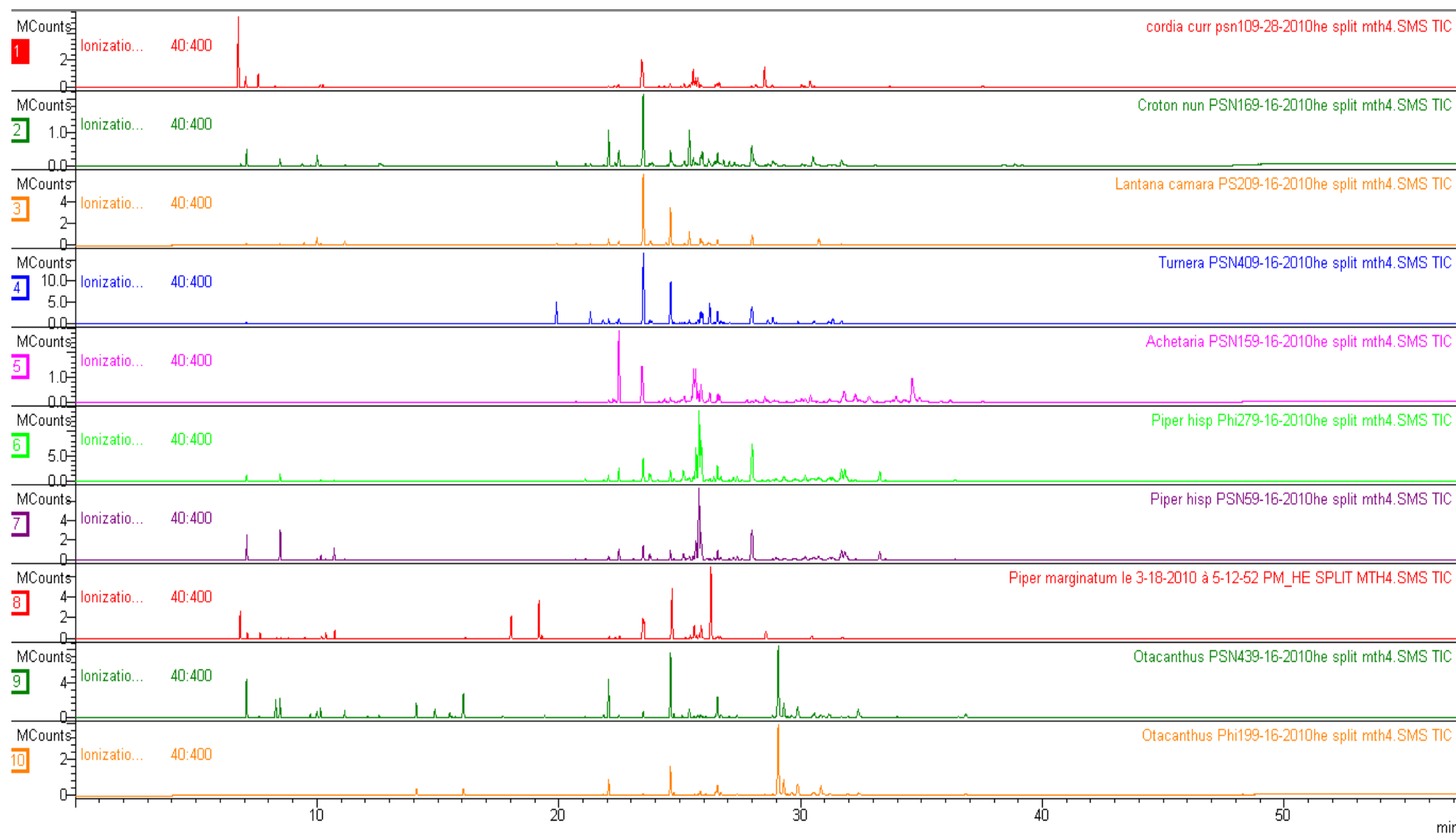


Annexe 22 : Chromatogrammes obtenus pour les huiles essentielles soumises à l'analyse en composantes principales, classés par catégories.

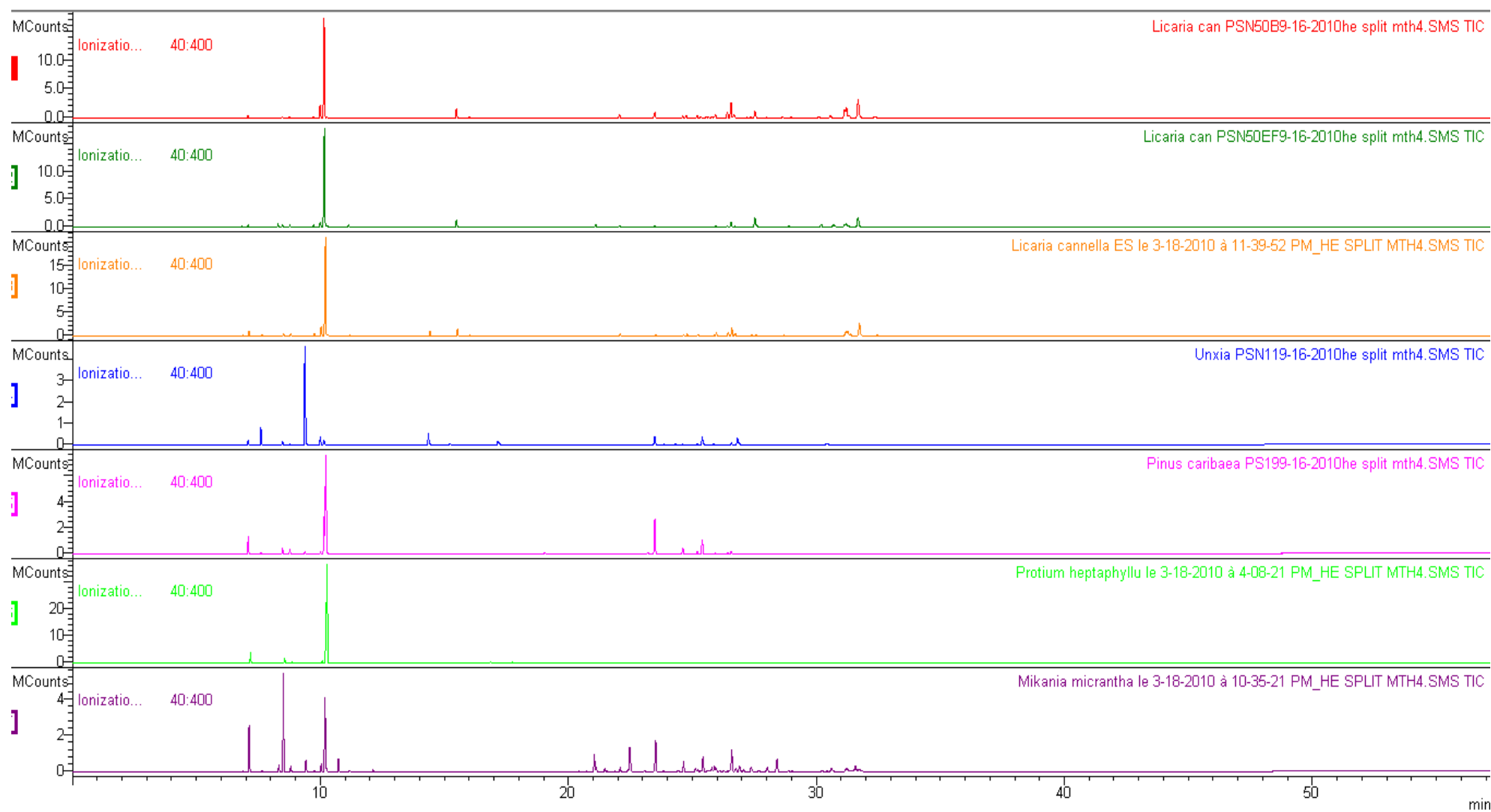
1. Chromatogrammes obtenus pour les huiles inhibant la croissance de *C. albicans in vitro*



2. Chromatogrammes obtenus pour les huiles situées dans la partie supérieure du graphique des individus ("score plot")



3. Chromatogrammes obtenus pour les huiles situées le long de l'axe de la première composante principale, à droite du graphique



Annexe 23 : Analyses GC/MS des fractions obtenues par chromatographie de l'huile essentielle d'*Otacanthus azureus* sur colonne de silice (AgNO₃ 1%, élution par un gradient hexane / dichlorométhane / acide acétique 2 %) après rassemblement.

La fraction F1 n'est pas représentée car non significative (aucun composé). Les numéros des fractions sont indiqués en haut à droite (OCF2 : *Otacanthus caeruleus* fraction 2). Le premier chromatogramme représente celui de l'huile essentielle d'*O. azureus* (syn. *caeruleus*)

